

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos - IQSC
Departamento de Físico Química
Grupo de Materiais Coloidais

Natália Mariana dos Santos

**Nanopartículas magnéticas biocompatíveis e funcionalizadas
com ácido fólico como potencial agente teranóstico no tratamento
de câncer via magnetohipertermia**

São Carlos
2021

Natália Mariana dos Santos

Nanopartículas magnéticas biocompatíveis e funcionalizadas com ácido fólico como potencial agente teranóstico no tratamento de câncer via magnetohipertermia

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em química

Área de concentração: Físico Química

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**São Carlos
2021**

A minha filha, minha maior motivação. A minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Agradecimentos

A minha filha, a pessoa mais importante da minha vida, minha motivação diária para nunca desistir e sempre buscar o melhor para nós.

A minha família por sempre apoiarem as minhas decisões e me proporcionar todo suporte para chegar até aqui. Em especial a minha mãe, que sempre cuidou e zelou por toda a família.

Ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda, pela orientação, ensinamento, oportunidade, paciência e amizade.

Aos companheiros do Grupo de Materiais Coloidais Bruno, Derik, Natália, Vinícius, Maria Eduarda, Caio, Daniel pelo apoio, companheirismo e amizade.

Aos amigos que fiz em São Carlos, Fernanda, Fábio, Adalberto, Elaine, Waguinho e Milena. Gratidão por ajudar essa jornada ser mais leve.

Aos amigos que fiz em Presidente Prudente, Shirley, Tamires, Agda, Mayk e Alessandro. Mesmo distantes, sempre demonstraram amizade, apoio e carinho.

Ao instituto de Química de São Carlos – USP, por toda a infraestrutura disponibilizada. Aos docentes e funcionários do IQSC, pelo trabalho de excelente qualidade, os quais muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Grupo de Eletroquímica do IQSC por disponibilizar equipamento necessário para analisar a superfície e estabilidade dos materiais obtidos nesse trabalho. Ao Prof. Dr. Daniel Reinaldo Cornejo, por disponibilizar equipamento para caracterização magnética necessária para obtenção dos resultados e discutidos nesse trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho, e para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À CNPq pela bolsa concedida (Nº processo: 133720/2019-5).

À CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

Nanopartículas (NPs) superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs, sigla em inglês) na fase magnetita (Fe_3O_4), com tamanho entre 8 e 28 nm, foram sintetizadas por uma rota de síntese verde, em meio aquoso (redução-precipitação), desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa. Curvas de histerese magnética demonstraram o comportamento superparamagnético e resultados de hipertermia indicaram potencial de aplicação em biomedicina com taxas de aquecimento da ordem de 1,37 °C/min. A superfície dos SPIONs foi modificada com 3-(aminopropil)trietóxisilano (APTS) e/ou 3-(mercaptopropil)trimetóxisilano (MPTMS), utilizando também uma metodologia verde, onde o meio de reação é uma mistura de água e metanol/etanol. Os parâmetros de síntese foram ajustados para promover a modificação das NP individualmente, evitando sua agregação. Caracterizações envolvendo espectroscopias infravermelho com transformada de Fourier e Raman, estabilidade coloidal (potencial zeta), tamanho hidrodinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios X (DRX), magnetometria de amostra vibrante (VSM) e hipertermia magnética, confirmaram a presença dos organossilanos na superfície das NP. Moléculas de ácido fólico foram modificadas com amino-tiol, para posterior acoplamento na superfície dos SPIONs recobertos com MPTMS promovendo sua biofuncionalização. Análises espectroscópicas confirmaram a formação da ligação amida entre o grupo carboxílico do ácido fólico e o grupo amina da cisteamina. O acoplamento de moléculas de ácido fólico puro (via ligação peptídica) ou modificado com cisteamina (via ligação dissulfeto) na superfície das NP recobertas com organossilanos, permitiu inserir reconhecimento celular com grupos folatos expressados em membranas de células tumorais. As análises espectroscópicas e de estabilidade coloidal comprovaram a funcionalização da superfície dos SPIONs com ácido fólico. Os resultados após o recobrimento e a funcionalização da superfície dos SPIONs não apresentaram mudança estrutural, exceto quando irradiado alta energia (Raman) e os valores das taxas de aquecimentos obtidos pela análise de hipertermia magnética diminuíram conforme adicionou-se novas moléculas na interface nas partículas, entretanto os resultados se mostraram adequados para futura aplicação no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Superparamagnetismo. Estabilidade Coloidal. Organossilanos. Ácido fólico.

Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in the magnetite phase (Fe_3O_4), with an average size between 8 and 28 nm, were synthesized by an aqueous green synthesis route (reduction-precipitation) developed in the research group. Magnetic hysteresis curves infer a superparamagnetic behavior, and hyperthermia results indicated potential application in biomedicine with heating rates around 1.37 °C/min. The SPIONs surface was modified with 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTS) or 3-(mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS), also in a green methodology, using a mixture of water and methanol/ethanol. The synthesis parameters were adjusted to promote the surface modification onto individual nanoparticles, avoiding their aggregation. Samples characterizations from Fourier-transform infrared and Raman spectroscopies, colloidal stability (zeta potential), hydrodynamic size (DLS), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetometry (VSM), and magnetic hyperthermia confirmed the presence of the organosilanes on the surface of SPIONs. Folic acid molecules were modified with amino-thiol for subsequent coupling on the surface of MPTMS-coated SPIONs, promoting their biofunctionalization. Spectroscopic analyses confirmed the formation of the amide bond between the folic acid carboxylic group and the amine group of cysteamine. Coupling of pure (via peptide bonding) or cysteamine-modified (via disulfide bonding) folic acid molecules on the surface of organosilane-coated NPs can provide cellular recognition with folate groups expressed on tumor cell membranes. Spectroscopic and colloidal stability analyses confirmed the functionalization of the surface of SPIONs with folic acid with both routes. Results after coating and surface functionalization of SPIONs did not dissipate structurally, except when irradiated with high energy (Raman) and the heating rate values obtained by magnetic hyperthermia analysis decreased as new molecules were added on the surface/interface of the nanoparticles; however, the results proved to be suitable for future application in cancer treatment.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Superparamagnetism. Colloidal stability. Organosilanes. Folic acid.

Lista de Figuras

Figura 1 – Escala comparativa para sistemas nanométricos.	15
Figura 2 – Nanoestruturas em confinamento quântico e suas respectivas dimensões.	16
Figura 3 – Abordagem clássica das fontes que originam o momento magnético de (a) orbital e (b) spin.	18
Figura 4 – Comportamento de um material diamagnético, a) ausência de um campo magnético externo ($H = 0$), e b) presença de um campo magnético externo $H \neq 0$).	19
Figura 5 – Comportamento de um material paramagnético, a) ausência de um campo magnético externo ($H = 0$), e b) presença de um campo magnético externo $H \neq 0$).	19
Figura 6 – Comportamento de um material ferromagnético, a) ausência de campo magnético externo ($H=0$), e b) parede de domínio.	20
Figura 7 – Comportamento de material antiferromagnético, a) alinhamento antiparalelo de momentos magnéticos de spins para óxido de manganês, b) dependência da suscetibilidade magnética (χ) e o inverso da suscetibilidade ($1/\chi$) com a temperatura para um material antiferromagnético (AF) e paramagnético (P), c) interação na interface entre um ferromagnético (FM) e um antiferromagnético (AF) produzindo um viés de troca.	21
Figura 8 – Contribuição do momento magnético dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita (Fe_3O_4).	22
Figura 9 – Comportamento magnético para materiais ferri- ou ferromagnéticos, a) representação dos dipolos magnéticos atômicos alinhados na mesma direção e variando de um domínio para o outro, b) comportamento B versus H inicial e a configuração de domínio em diferentes estágios, c) loop de histerese.	23
Figura 10 – Comportamento superparamagnético, a) representação da mudança do comportamento ferri- ou ferromagnético para superparamagnético, quando o material se encontra abaixo do tamanho crítico ($D < D_c$), b) curva de magnetização com coercividade e remanência nula.	24
Figura 11 - Etapas de formação das nanopartículas.	26
Figura 12 – a) processo de nucleação rápido, b) processo de nucleação lento, c) dependência do tempo com a distribuição de núcleos estáveis uniformes relacionado aos diagramas a) e b).	27
Figura 13 – Representação da distribuição de cargas na superfície da partícula e no meio de dispersão, formando a dupla camada elétrica, e seus respectivos potenciais na interfase sólido-líquido.	29

Figura 14 – Reação de hidrólise e condensação de alcoxissilanos na superfície de um substrato.....	32
Figura 15 – Efeito do pH na hidrólise dos alcoxissilanos.....	33
Figura 16 – Mecanismo de hidrólise em diferentes meios (TS= estado de transição, IM= intermediário).....	34
Figura 17 – Estrutura do ácido fólico.	36
Figura 18 – Sistema de entrega de drogas e processo de endocitose de receptor folato.	38
Figura 19 – Representação dos <i>loops</i> de histerese para nanopartículas pseudo-paramagnética, superparamagnética e ferromagnéticas, e os relaxamentos de Néel e Browniano.....	39
Figura 20 – Representação do sistema experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.	42
Figura 21 – Fluxograma do procedimento experimental da síntese dos SPIONs de magnetita em meio aquoso.....	43
Figura 22 - Fluxograma do procedimento experimental do recobrimento da superfície dos SPIONs com 3(aminopropil)trietóxisilano.	45
Figura 23 - Fluxograma do procedimento experimental do recobrimento da superfície dos SPIONs com 3-(mercaptopropil)trimetóxisilano.	46
Figura 24 – Fluxograma do procedimento da ativação do ácido fólico via DDC/NHS.	47
Figura 25 – Fluxograma do procedimento experimental da funcionalização com ácido fólico na superfície dos SPIONs modificado com 3-(aminopropil)trietóxisilano.....	48
Figura 26 – Fluxograma do procedimento de conjugação da cisteamina com ácido fólico via ligação amida.....	49
Figura 27 - Fluxograma do procedimento experimental do acoplamento CYS-FA na superfície das SPIONS modificadas com 3-mercaptopropil-trimetóxisilano via ligação dissulfeto.	51
Figura 28 – a) Estrutura do íon complexo férrico hexaaquo, b) Equilíbrios da hidrólise do íon complexo férrico.....	55
Figura 29 – Mecanismo cinético da redução de íons férricos em ferrosos utilizando sulfito como agente redutor.....	56
Figura 30 - Amostra de SPIONs com comportamento ferrofluido na presença de um ímã.....	57
Figura 31 – Difractometria de Raio X da amostra de SPIONs sintetizada via redução-precipitação e padrão JCPDF 19-629.	59

Figura 32- Imagens TEM dos SPIONs sintetizados via redução-precipitação em meio aquoso e respectivo histograma da distribuição de tamanhos.	60
Figura 33- Imagem TEM, a) SPIONs, b) FFT da indicada em (a), c) HRTEM mostrando planos cristalográficos e d) FFT da região destacada em (c).	62
Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de SPIONs.	63
Figura 35 – Espectro Raman da amostra de SPIONs nas intensidades de laser 10% e 100%.	65
Figura 36 – Potencial Zeta e mobilidade eletroforética das nanopartículas de magnetita dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	68
Figura 37 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico (Z-average) versus pH dos SPIONs.	69
Figura 38- a) Curvas de distribuição de tamanho em função do número de partículas para os SPIONs, b) Histograma de distribuição de tamanho, c) Curvas do potencial zeta dos SPIONs.....	70
Figura 39 – Curva de histerese magnética dos SPIONs de magnetita. No detalhe uma ampliação indicando os valores de coercividade.	72
Figura 40 – a) Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação de campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) b) Ajuste de Lucas-Box.....	73
Figura 41 – Possíveis ligações/interações do APTS com a superfície dos SPIONs.	75
Figura 42 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 1), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS.	76
Figura 43 – Microscopia eletrônica de transmissão da modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com APTS (SPION@APTS 1).	79
Figura 44 – Potencial Zeta e mobilidade eletroforética em função do pH dos SPIONs e após recobertos com APTS (SPION@APTS 1), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.....	79
Figura 45 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 2-5), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrada a estrutura do SPION modificado com APTS.	81
Figura 46 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a-b) SPION@APTS 2, c-d) SPION@APTS 3, e-f) SPION@APTS 4.....	83

Figura 47 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e com recobrimento variando o pH do meio de reação para 4 (SPION@APTS 2), 7 (SPION@APTS 3), 10 (SPION@APTS 4) e 11 (SPION@APTS 5), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	84
Figura 48 - Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 6-8), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS.	87
Figura 49 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a-b) SPION@APTS 6, c-d) SPION@APTS 7, e-f) SPION@APTS 8.	88
Figura 50 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e recobertas com APTS em pH 11 variando a proporção SPION/APTS em 1:2 (SPION@APTS 6), 1:5 (SPION@APTS 7), 1:10 (SPION@APTS 8), dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	89
Figura 51 – Espectro Raman da amostra antes do recobrimento (SPION) e após recoberta com APTS (SPION@APTS) utilizando laser 785 nm e intensidade de 100%.	90
Figura 52 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico <i>versus</i> pH da amostra SPION@APTS.	92
Figura 53 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@APTS 6.	93
Figura 54 - Curva de magnetização de saturação da magnetita recoberta com APTS (SPION@APTS).	94
Figura 55 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTMS 1-3), b) Recorte na região da ligação Fe-O, c) Recorte na região da ligação S-H. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com MPTS.	96
Figura 56 - Espectros Raman das amostras de óxidos de ferro recobertos com MPTMS.	97
Figura 57 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para amostra de SPION recoberta com MPTMS (SPION@MPTMS 1).	99
Figura 58 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e recobertas com MPTMS nas proporções SPION/MPTMS 1:1 (SPION@MPTMS 1), 1:2 (SPION@MPTMS 2) e 1:3 (SPION@MPTMS 3), dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	100

Figura 59 - Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico <i>versus</i> pH da amostra SPION@MPTMS 1.	102
Figura 60 - Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@MPTMS 1.	103
Figura 61 – Mecanismo de ativação do ácido fólico via DDC/NHS e posterior reação com amina primária para formação da ligação amida.	104
Figura 62 – Solução de ácido fólico ativado (FA-NHS) pelo método da carbodiimina e seu subproduto, diciclohexiluréia (DCU), removido por filtração.	105
Figura 63 - Espectros FTIR a) amostras de nanopartículas antes do recobrimento (SPION), recobertas com APTS (SPION@APTS), e após a funcionalização com o ácido fólico (SPION@APTS@FA), b) recorte na região da ligação amida, c) recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS e funcionalizado com o ácido fólico.	106
Figura 64 – Espectroscopia na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas antes de recobrir (SPION), após o recobrimento com APTS (SPION@APTS), funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@AF) e do ácido fólico livre.	108
Figura 65 - Espectro Raman da amostra recoberta com APTS (SPION@APTS) e após a funcionalização com ácido fólico (SPION@APTS@FA) utilizando laser 785 nm e intensidade de 100%.	109
Figura 66 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para amostra de SPION recoberta com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA).	111
Figura 67 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION), recobertas com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	112
Figura 68 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico <i>versus</i> pH da amostra SPION@APTS@FA.	113
Figura 69 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@APTS@FA.	114
Figura 70 – DRX das amostras SPION, SPION@APTS e SPION@APTS@FA. ...	115
Figura 71 – Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação do campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) das amostras sem recobrimento (SPION), recoberta com APTS (SPION@APTS) e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA).	116
Figura 72 – Mecanismo geral da reação para o acoplamento ácido fólico e cisteamina (CYS-FA)	118

Figura 73 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos precursores ácido fólico e cisteamina, e da amostra CYS-FA.....	118
Figura 74 - Espectroscopia na região do UV-Vis dos precursores cisteamina e ácido fólico, e da amostra CYS-FA.....	120
Figura 75 – Balão de síntese da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.....	121
Figura 76 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes do recobrimento (SPION), após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTS), e após a funcionalização com o ácido fólico modificado com a cisteamina (SPION@MPTMS@CYS-FA), b) Recorte na região das ligações Fe-O e S-S.....	121
Figura 77 - Espectroscopia na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas antes de recobrir (SPION), após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTMS), funcionalizada com ácido fólico modificado com cisteamina (SPION@MPTMS@CYS-AF) e do ácido fólico livre.....	123
Figura 78 – Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION), recobertas com MPTMS e funcionalizada com ácido fólico modificado com cisteamina(SPION@MPTMS@CYS-FA), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.	124
Figura 79 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico <i>versus</i> pH da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.....	125
Figura 80 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.....	126
Figura 81 – DRX das amostras SPION, SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA.....	127
Figura 82 - Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação do campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) das amostras sem recobrimento (SPION), recoberta com MPTMS (SPION@MPTS) e funcionalizada com ácido fólico (SPION@MPTMS@CYS-FA).....	128

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação de diferentes métodos de síntese para produção de nanopartículas, incluindo as nanopartículas magnéticas.	25
Tabela 2 – Valores utilizados para o cálculo do D_{DRX} e seus respectivos valores.....	60
Tabela 3 – Dados para os cálculos dos planos cristalográficos[JCPDF 19-629].	62
Tabela 4 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho dos SPIONs.	63
Tabela 5 – Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro.	65
Tabela 6 – Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para a amostra de SPIONs.....	74
Tabela 7 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 1.....	77
Tabela 8 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 2-5.....	81
Tabela 9 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 6-8.....	87
Tabela 10 – Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com APTS.	91
Tabela 11 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@MPTMS 1-3.	96
Tabela 12 - Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com MPTMS.....	98
Tabela 13 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION@APTS e SPION@APTS@FA.....	106
Tabela 14 - Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com APTS (SPION@APTS) e funcionalizados com ácido fólico (SPION@APTS@FA).	110
Tabela 15 – Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para as amostras SPION, SPION@APTS e SPION@APTS@FA.....	117
Tabela 16 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho da amostra CYS-FA.	119
Tabela 17 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho da amostra SPION@APTS@FA.	122
Tabela 18 - Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para as amostras SPION, SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA	129

Lista de Abreviaturas e Siglas

CYS-FA – Ácido Fólico acoplado com cisteamina	FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
SPION – Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas	H – Campo Magnético
SPION@APTS - Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com APTS	H _c – Campo coercivo ou coercividade
SPION@APTS@FA - Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com APTS e funcionalizadas com ácido fólico	ILP – Poder de perda íntinseca
SPION@MPTMS - Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com MPTMS	M – Momento magnético
SPION@MPTMS@CYS-FA - Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com MPTMS e funcionalizadas com CYS-FA	MPTMS - 3-(mercaptopropil)trimetóxissilano
AMF – Campo magnético alternado	M _r – Magnetização remanente ou remanência
AF- Antiferromagnético	MRI -Imagem por ressonância magnética
APTS - 3-(aminopropil)trietóxissilano	M _s – Magnetização de saturação
CYS- cisteamina	MET – Microscopia Eletrônica de transmissão
Dc – Diâmetro crítico	MNP – Nanopartículas magnéticas
DDC – <i>N,N'</i> -díciclohexilcarbodiimida	NHS – N-Hidroxisuccinamida
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico	NPs - Nanopartículas
DMSO - dimetilsulfóxido	P – Paramagnético
DRX – Difractometria de raios X	P _{CZ} - Potencial de carga zero
FA – Ácido fólico	P _{IE} - Potencial isoelétrico
Fe ₃ O ₄ - Magnetita	RF – Radiofrequência
FM – Ferromagnético	SAR – Taxa de absorção específica
	S _{CRl} – Saturação crítica
	SLP – Poder de perda específico
	T _C - Temperatura crítica
	VSM – Magnometria de amostra vibrante
	α-Fe ₂ O ₃ – Hematita
	γ-Fe ₂ O ₃ – Maghemita
	ζ – Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Nanomateriais.....	15
1.2. Magnetismo	17
1.3. Métodos de síntese de nanopartículas magnéticas	24
1.4. Estabilidade Coloidal	27
1.5. Modificação e funcionalização de superfície de nanopartículas	30
1.6. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas.....	36
2. OBJETIVOS	40
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
3.1. Preparação das amostras.....	41
3.2. Síntese dos SPIONs de magnetita em meio aquoso.....	42
3.3. Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com diferentes alcoxissilanos	44
3.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico (FA).....	47
3.5. Caracterização das amostras	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de magnetita em meio aquoso	54
4.2. Caracterização e análise estrutural, composicional e morfológica das nanopartículas sintetizadas em meio aquoso.....	58
4.3. Modificação da superfície dos SPIONs com diferentes alcoxissilanos	74
4.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico.....	104
5. CONCLUSÕES	129
6. PERSPECTIVAS	131
REFERÊNCIAS	132

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia opera com dispositivos e materiais de modo a modelar, preparar, estudar e caracterizar nanomateriais com diferentes formatos, tamanhos e funcionalidades para diversas aplicações em diferentes áreas¹. Nanopartículas (NPs) com dimensões entre 1 a 100 nm, podem apresentar diferentes propriedades química e física como, por exemplo, resistência mecânica, polarização elétrica, magnetização, propriedades ópticas, de transporte, fotoquímicas e catalíticas, quando comparadas com o mesmo material na sua forma “bulk” ou estendida².

Atualmente nanopartículas magnéticas são de grande interesse da pesquisa fundamental e tecnológica devido as suas propriedades singulares para aplicação em sistemas catalíticos, nas áreas de biotecnologia e biomedicina, em sistemas de imageamento por ressonância magnética, hipertermia magnética, remediação ambiental, dentre outras^{3,4}. Para que os materiais magnéticos possam ser aplicados nessas diversas áreas, e se mantenham estáveis no sistema em diferentes condições, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas e metodologias, com o propósito de obter uma melhor distribuição do tamanho das partículas, biocompatibilidade, baixa toxicidade, propriedades de superfícies adequadas, dentre outros parâmetros⁵.

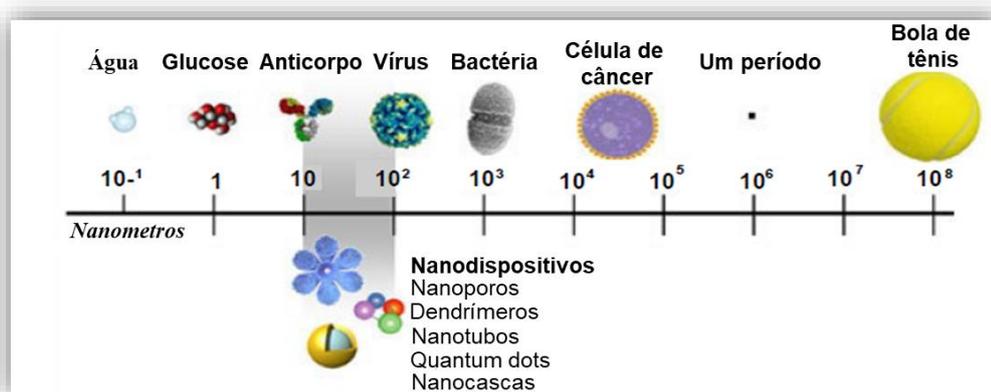
Apesar da diversidade de composições de nanopartículas magnéticas, as de óxido de ferro têm chamado mais atenção, devido as suas propriedades magnéticas: superparamagnetismo (coercividade próxima de zero ou nula), baixa temperatura de Curie e alta susceptibilidade magnética além de toxicidade relativamente baixa para aplicações em sistemas vivos, quando comparadas a outros materiais magnéticos⁶⁻¹⁰. Para serem utilizadas nos tratamentos via hipertermia magnética, as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPION) devem apresentar, além do comportamento superparamagnético e biocompatibilidade, elevada capacidade de converter a energia absorvida pelo campo magnético alternado aplicado em energia térmica para promover o aquecimento local.

Com a finalidade das aplicações terapêuticas e de diagnóstico serem mais eficientes, as nanopartículas devem ser posicionadas próximas ou no interior das células tumorais, o que pode ser obtido conjugando moléculas direcionadoras ou de reconhecimento celular específico à superfície das partículas¹¹. Além da biocompatibilidade, a presença de funcionalização extra inorgânica ou orgânica na superfície dos SPIONs previne a oxidação e também reduz a toxicidade¹²⁻¹⁴.

1.1. Nanomateriais

A etimologia do prefixo “nano” é proveniente do vocabulário grego “*nanos*”, que significa “anão”, e corresponde a um milionésimo de um metro (10^{-9} m)¹⁵. A Figura 1 é uma escala em nanômetros, onde os nanomateriais estão compreendidos entre os anticorpos (10 nm) e os vírus (10^2 nm).

Figura 1 – Escala comparativa para sistemas nanométricos.



Fonte: Adaptado de Chakraborty *et al.*(2016, p.2)¹⁶.

Os conceitos envolvendo nanociência e nanotecnologia começou por volta do ano de 1959 por um dos maiores físicos do século XX, Richard Feynman, em uma palestra intitulada “Há muito espaço na parte inferior”, muito antes do desenvolvimento de instrumentos para caracterização e manipulação de átomos individualmente, onde estudos nessa área avançou por volta dos anos 90^{2,17,18}. Os nanomateriais podem ser definidos como materiais onde pelo menos uma de suas dimensões está na faixa de nanoescala (1-100 nm). Podemos classificar uma nanoestrutura conforme a sua dimensionalidade¹⁹:

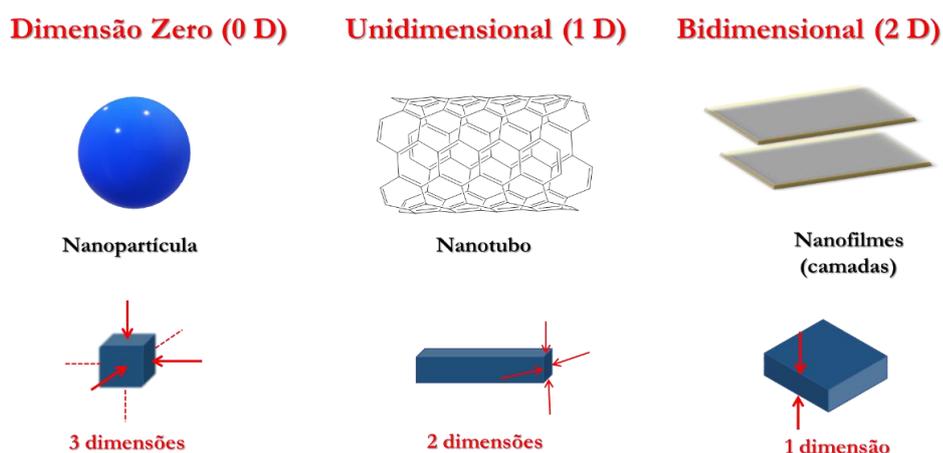
- **Nanomateriais zero-dimensionais (0-D):** possuem todas as suas três dimensões na faixa de nanoescala. Exemplos desses nanomateriais são as nanopartículas e os pontos quânticos.

- **Nanomateriais unidimensionais (1-D):** possuem duas de suas dimensões na faixa de nanoescala, conferindo uma morfologia unidimensional. Nanotubos, nanobastões, nanofios ou nanofitas pertencem a essa classe de nanomateriais.

- **Nanomateriais bidimensionais (2-D):** possui uma de suas dimensões na faixa de nanoescala. Também conhecidos como poços quânticos ou nanofilmes (filmes finos), nanocamadas, nanorevestimentos, nanofolhas.

A Figura 2 ilustra a dimensionalidade de nanoestruturas 0D, 1D e 2D.

Figura 2 – Nanoestruturas em confinamento quântico e suas respectivas dimensões.



Fonte: Autoria própria

A formação de nanomateriais pode ocorrer por duas principais rotas²⁰:

- *Top-down*: síntese que ocorre de “cima para baixo”, ou seja, materiais *bulk* com grandes volumes, podem ser atritados ou desgastados até um tamanho reduzido. Exemplos: fotolitografia, litografia por feixe de elétrons e alguns processos físicos para a síntese de nanopartículas metálicas. As desvantagens dessa metodologia são: resolução limitada das lentes ópticas, custos elevados, métodos lentos, materiais não uniformes, baixa homogeneidade e alto grau de contaminação.

- *Bottom-up*: síntese que ocorre de “baixo para cima”, ou seja, os componentes dissolvidos em um solvente colidem aleatoriamente formando nanoestruturas complexas. A entropia é um fator determinante para que a automontagem ocorra através de equilíbrios, onde a estrutura final deve ser minimamente estável em temperatura ambiente, mas simultaneamente ligada fracamente, para que as estruturas errôneas se dissociem e atinjam a configuração desejada de menor energia. Exemplo: Síntese de NPs metálicas. Tem como desvantagem necessitar de ajustes finos de parâmetros para conseguir obter o controle do material desejado.

Dentre os principais fatores que diferenciam as propriedades dos nanomateriais está o efeito da proeminente relação de área de superfície/volume, considerando que

para um mesmo volume de material, quanto menor for a partícula, maior será sua área de superfície, tornando mais importante os efeitos de superfície para determinação dessas propriedades. Outro fator importante nas propriedades das nanoestruturas é o efeito de confinamento quântico, que só é observado para materiais abaixo do tamanho crítico, levando às funções de ondas eletrônicas a ficarem mais fortemente confinadas, melhorando características como reatividade, propriedades elétricas, ópticas e magnéticas⁵.

Os nanomateriais também podem ser classificados com base na sua morfologia, tamanho, propriedades, bem como, pelos seus constituintes¹⁹.

- **Nanomateriais à base de carbono:** nanotubos de carbono e os fulerenos são exemplos de nanomateriais considerados alótropos de carbono. Possuem boas propriedades elétricas, condutividade, afinidade eletrônica e alta resistência.

- **Nanomateriais metálicos:** os materiais de partidas são íons divalentes e trivalente, e quando utilizado agentes redutores, esses íons são reduzidos a nanopartículas metálicas. Possuem boa capacidade de adsorção de moléculas pequenas, e podem ser dopadas com diferentes elementos.

- **Nanomateriais semicondutores:** possuem propriedades metálicas e não-metálica e são amplamente utilizados em fotocatalise e dispositivos eletrônicos. O grafeno é um exemplo de nanomaterial que promove a melhoria de propriedades químicas e físicas de um semicondutor.

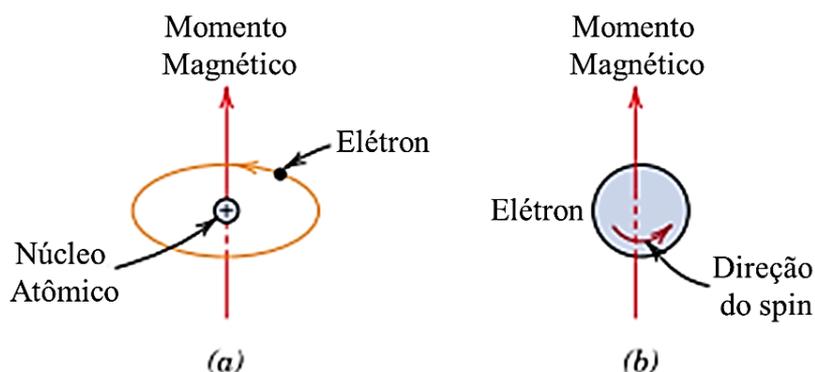
- **Nanocompositos:** são materiais sólidos polifásicos, na qual podem ter de uma até três dimensões inferiores a 100 nm. Há diferentes nanocompósitos como os de matriz cerâmica, matriz metálica e de matriz polimérica. Os mais comuns são os nacompositos poliméricos, à base de grafeno e os óxidos de metais.

1.2. Magnetismo

Para entender o comportamento das nanoestruturas magnéticas, é necessário compreender o magnetismo em escala atômica, pois as propriedades magnéticas macroscópicas são influenciadas pelos momentos associados a elétrons individuais. Assim é possível correlacionar a variação de tamanho com o comportamento magnético desses materiais. Numa abordagem clássica, forças magnéticas podem ser definidas como o movimento de partículas eletricamente carregadas, sendo

representada como campo (H). Os momentos magnéticos de cada átomo individualmente podem ser originados do movimento orbital em torno do núcleo (momento de orbital, μ_l), ou do elétron girando em torno do próprio eixo (momento de *spin*, μ_s)²¹, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3 – Abordagem clássica das fontes que originam o momento magnético de (a) orbital e (b) *spin*.



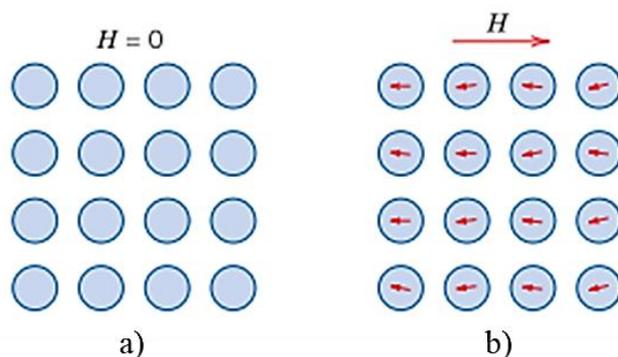
Fonte: Adaptado de Callister (1940, p.81)²¹.

Cada elétron de um átomo pode ser considerado pequenos ímãs por possuírem momentos de orbitais e momentos de *spins* magnéticos permanentes. A soma vetorial de todos os momentos magnéticos resulta no momento magnético total e pode ser associado ao volume do material²¹.

$$\text{Propriedades magnéticas macroscópicas} = \sum \text{Momentos magnéticos dos elétrons individuais}$$

Em um átomo, os elétrons possuem momentos angulares de *spins* intrínsecos com número quântico $s = \pm \frac{1}{2}$. Há apenas dois possíveis estados de momento angular, onde os momentos magnéticos de *spin* podem se orientar paralelamente ou antiparalelos²². Quando as camadas ou subcamadas de um átomo estão completamente preenchidas, os momentos de orbital e de *spin* são totalmente cancelados, conseqüentemente esses materiais não são capazes de ser magnetizados permanentemente, por exemplo, os gases nobres. Esse comportamento pode ser atribuído à material diamagnético. Apesar da ausência do momento magnético permanente, quando aplicado um campo magnético externo, ele apresenta um magnetismo muito fraco, que é induzido por uma mudança do movimento dos orbitais dos elétrons²¹, conforme ilustrado na Figura 4. Para esses materiais a susceptibilidade magnética é negativa^{21,23}.

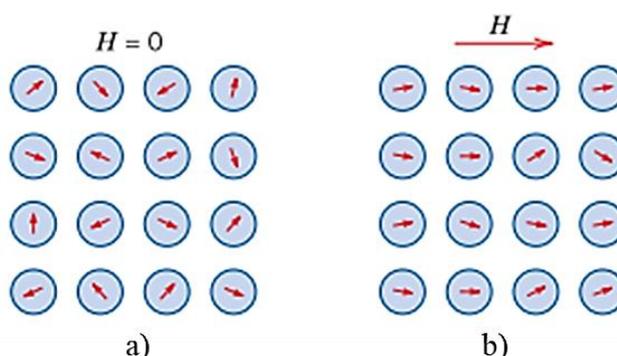
Figura 4 – Comportamento de um material diamagnético, a) ausência de um campo magnético externo ($H = 0$), e b) presença de um campo magnético externo $H \neq 0$.



Fonte: Adaptado de Callister (1940, p.82)²¹

Quando o cancelamento dos momentos magnéticos de orbitais e/ou dos *spins* dos elétrons ocorrem parcialmente, o átomo passa a ter um pequeno momento magnético líquido. Quando não há presença de um campo magnético externo ($H=0$), os momentos estão direcionados aleatoriamente, resultando em um momento magnético líquido igual a zero, porém, quando o campo magnético externo é aplicado ($H \neq 0$), os dipolos atômicos se alinham por rotação ao longo do campo resultando no paramagnetismo, representado na Figura 5. Nesse caso, os dipolos magnéticos não possuem interações mútuas com os dipolos adjacentes, como consequência, o momento magnético líquido e a susceptibilidade são pequenos e positivos^{21,23}.

Figura 5 – Comportamento de um material paramagnético, a) ausência de um campo magnético externo ($H = 0$), e b) presença de um campo magnético externo $H \neq 0$.

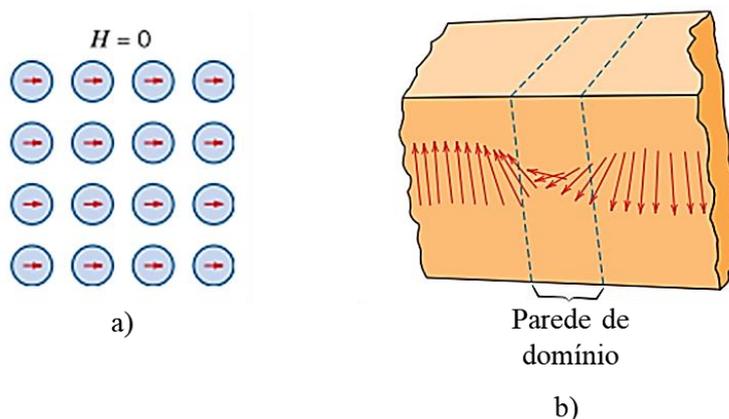


Fonte: Adaptado de Callister (1940, p.82)²¹

Estruturas atômicas na qual possuem *spins* de elétrons que não foram cancelados, apresentam momentos de magnetização atômica, resultando em momentos magnéticos permanentes (Figura 6a). Esses materiais são conhecidos como ferromagnéticos, diferentemente dos materiais paramagnéticos, possuem

interações de acoplamento entre os momentos de átomos adjacentes, denominados “interações de troca”, alinhando-se paralelamente entre si em grandes regiões conhecidas como domínios magnéticos (Figura 6b). Mesmo na ausência de campo externo, apresentam magnetização espontânea^{21,23}.

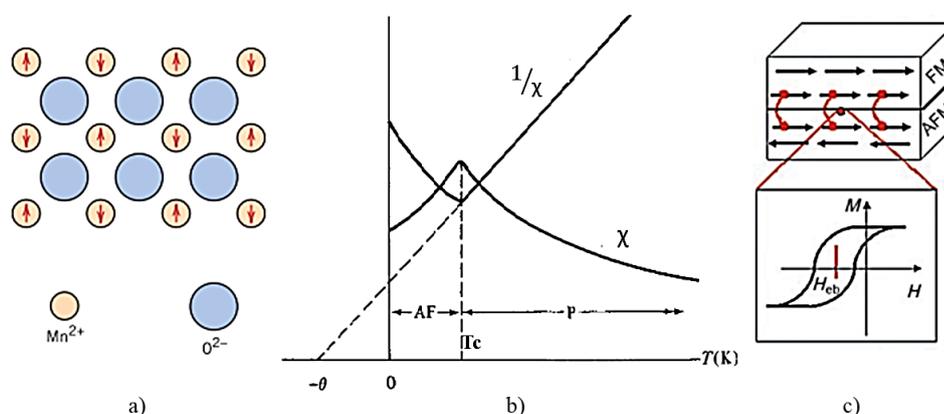
Figura 6 – Comportamento de um material ferromagnético, a) ausência de campo magnético externo ($H=0$), e b) parede de domínio.



Fonte: Adaptado de Callister (1940, p.84, p.91)²¹

Materiais antiferromagnéticos e ferrimagnéticos possuem momentos magnéticos atômicos que se alinham espontaneamente, permitindo classifica-los como subclasse dos materiais ferromagnéticos, e são diferenciados pelo fato dos alinhamentos ocorrerem antiparalelamente. Os antiferromagnéticos possuem os momentos magnéticos de *spins* opostos que se cancelam, resultando em um material com o momento magnético líquido nulo^{21,24}, exemplificado por um óxido de manganês na Figura 7a. Há uma dependência da suscetibilidade magnética desses materiais com a temperatura. À medida que a temperatura diminui a suscetibilidade aumenta até atingir um máximo que corresponde a uma temperatura crítica (T_c). Na Figura 7b, nota-se que uma substância é paramagnética acima de T_c e seu comportamento passa ser antiferromagnética abaixo de T_c , tornando-se interessante para aplicação que utilizam o viés de troca²⁵, representado na Figura 7c.

Figura 7 – Comportamento de material antiferromagnético, a) alinhamento antiparalelo de momentos magnéticos de spins para óxido de manganês, b) dependência da suscetibilidade magnética (χ) e o inverso da suscetibilidade ($1/\chi$) com a temperatura para um material antiferromagnético (AF) e paramagnético (P), c) interação na interface entre um ferromagnético (FM) e um antiferromagnético (AF) produzindo um viés de troca.

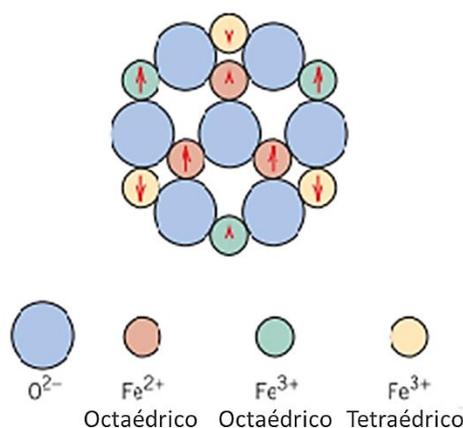


Fonte: Adaptado de a) Callister (1940, p.85)²¹, b) Cullity, B. D.; Graham, C. D (2008, p.157)²⁵ e c) Lu (2007, p.1224)²⁶

Nos materiais ferrimagnéticos também ocorre o acoplamento de *spins* antiparalelos, assim como nos materiais antiferromagnéticos, o que difere ambos é o cancelamento incompleto que ocorre nos momentos de rotação dos *spins* dos ferrimagnético²¹. Esses materiais apresentam uma magnetização espontânea à temperatura ambiente, que se extingue ao atingir uma temperatura crítica, também conhecida como temperatura de Curie, tornando-se um material paramagnético²⁵.

As ferritas são exemplos de materiais com o comportamento ferrimagnético, na qual possuem a fórmula MFe_2O_4 , sendo M um elemento metálico. A magnetita, Fe_3O_4 ($Fe^{II}Fe^{III}_2O_4$) é uma ferrita de origem mineral, que possui íons Fe^{2+} e Fe^{3+} ocupando sítios intersticiais octaédricos e íons Fe^{3+} ocupando sítios intersticiais tetraédricos, na proporção 1:2, conferindo uma estrutura cristalina do tipo espinélio invertida (AB_2O_4)^{21,27}. Os íons Fe^{3+} não contribuem para a magnetização resultante, pois seus momentos se cancelarem. Portanto, o momento magnético líquido é decorrente do alinhamento paralelo dos momentos provenientes dos íons Fe^{2+} , demonstrados na Figura 8.

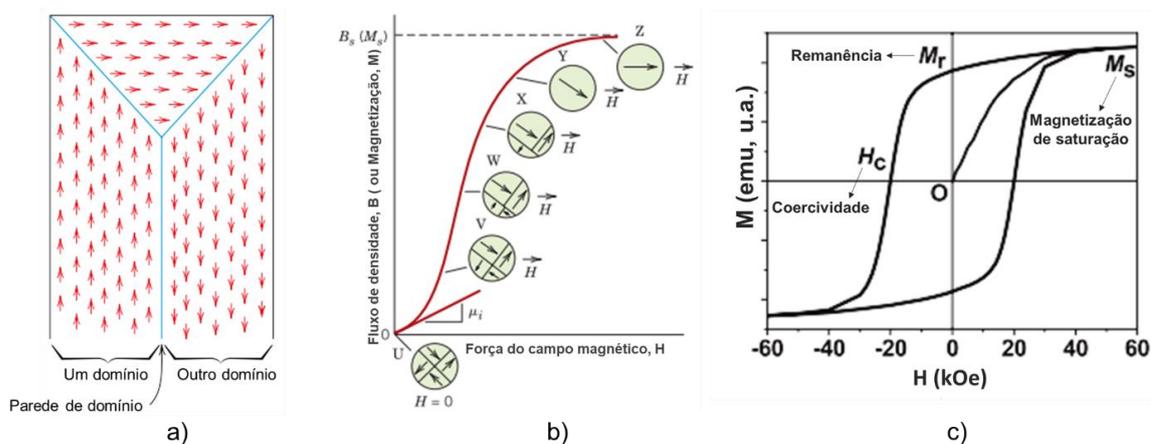
Figura 8 – Contribuição do momento magnético dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita (Fe_3O_4).



Fonte: Adaptado de Callister (1940, p.86)²¹

Materiais ferro- ou ferrimagnéticos são formados por regiões de orientação com momento magnético, denominados de domínios magnéticos. Os domínios são delimitados por “paredes de domínio”, na qual a direção de orientação dos momentos muda gradualmente (Figura 6b). Um material macroscópico pode conter inúmeros domínios, ou seja, multidomínios²¹ (Figura 9a). As propriedades magnéticas desses materiais são caracterizadas por um *loop* de histerese, onde é obtida a mudança do momento magnético (M), pela força de um campo magnético (H)²⁸. Inicialmente, aplica-se um campo magnético externo em um material não magnetizado. Conforme aumenta H , ocorre o deslocamento das paredes de domínio, alterando a forma e tamanho do domínio, para que ocorra o seu alinhamento na mesma direção do campo aplicado (Figura 9b). Ao alcançar uma região de domínio único, ou o máximo de alinhamento possível, ocorre uma magnetização máxima denominada magnetização de saturação (M_s). Entretanto, quando ocorre a reversão da direção do campo, e há um decaimento no comportamento da curva, ela não irá seguir o caminho original por conta do efeito de histerese, ocasionado pelo acoplamento dos domínios magnéticos. A remanência (M_r), é a magnetização residual quando o campo tem valor igual a zero ($H=0$). Por fim, para que ocorra a total desmagnetização do material após a saturação até obter um valor de magnetização igual a zero, é aplicado um campo magnético externo na direção oposta ao do campo original, desestabilizando a magnetização remanente do material e obtendo um valor de coercividade ou campo coercivo (H_c). O ciclo completo é obtido após obter uma magnetização máxima para o campo inverso²¹, e é ilustrado na Figura 9c.

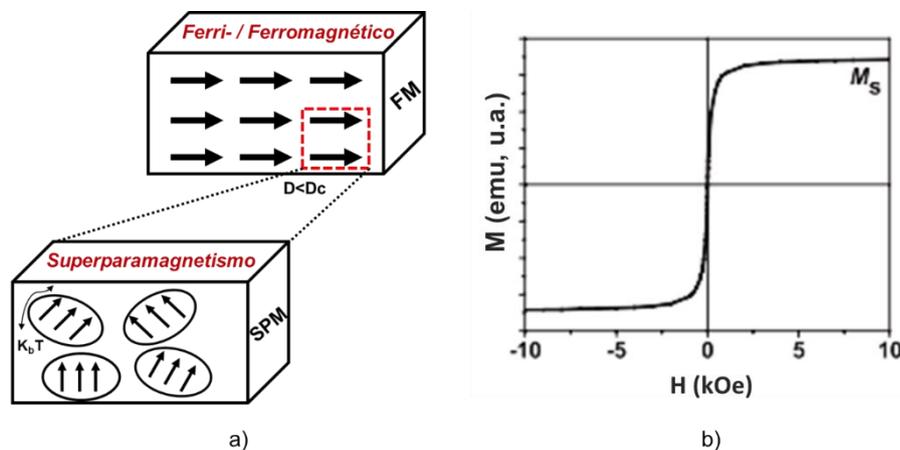
Figura 9 – Comportamento magnético para materiais ferri- ou ferromagnéticos, a) representação dos dipolos magnéticos atômicos alinhados na mesma direção e variando de um domínio para o outro, b) comportamento B versus H inicial e a configuração de domínio em diferentes estágios, c) loop de histerese.



Fonte: Adaptado de a) e b) Callister (1940, p.90, p.91)²¹ e c) Sun (2006, p.393)²⁸

Com a diminuição do tamanho das partículas de magnetita, para uma escala nanométrica e abaixo do diâmetro crítico (D_c), o material passa a exibir apenas um único domínio magnético, se comportando como um conjunto de momentos paramagnético gigante e que não interagem, podendo flutuar quando a energia térmica ($K_B T$) for maior que a energia de anisotropia²⁶, ilustrado na Figura 10a. Na condição de monodomínio, ocorre um estado de magnetização uniforme em qualquer campo, permitindo a rápida orientação da partícula ao campo magnético externo aplicado, fenômeno denominado superparamagnetismo (Figura 10a). Diferente do magnetismo (multidomínios), as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnética (SPIONs), em temperatura ambiente, não retêm nenhuma magnetização quando o campo magnético externo é removido, apresentando remanência ou coercividade nula, ou seja, não há histerese na curva de magnetização^{29–31}, como demonstrado na Figura 10b. Devido essas propriedades, associadas com a alta susceptibilidade magnética e uma baixa temperatura de Curie, que SPIONs são indicados para aplicações biomédicas³², como: entrega de drogas, tratamentos por hipertermia, imageamento por ressonância magnética (MRI), reparação de tecidos etc³².

Figura 10 – Comportamento superparamagnético, a) representação da mudança do comportamento ferri- ou ferromagnético para superparamagnético, quando o material se encontra abaixo do tamanho crítico ($D < D_c$), b) curva de magnetização com coercividade e remanência nula.



Fonte: Adaptado de a) Lu (2007, p. 1224)²⁶ e b) Sun (2006, p.393)²⁸

1.3. Métodos de síntese de nanopartículas magnéticas

Estudos que descrevam rotas sintéticas eficientes para produção de nanopartículas magnéticas se intensificaram durante os últimos anos. Esse aumento ocorreu devido à variedade das aplicações desses materiais em diversos campos de estudos, sendo possível obter controle de forma e de tamanho, estabilidade em diferentes meios de dispersão, distintas composições de fases como, por exemplo óxidos de ferro metálicos (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), metais puros (Fe, Co), ferritas dopadas (MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4), ligas metálicas (CoPt_3 , FePt), dentre outras, onde todas elas influenciam diretamente nas propriedades do nanomaterial⁵. Os métodos de síntese das nanopartículas de óxido de ferro variam conforme o objetivo da aplicação de cada sistema, como resumido na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação de diferentes métodos de síntese para produção de nanopartículas, incluindo as nanopartículas magnéticas.

Métodos de Sínteses	Faixa	Distribuição	Controle de Forma	Síntese	Temperatura	Tempo	Rendimento
Aerosol/vapor	5-60 nm	Larga	Bom	Complicada, vácuo/atmosfera inerte	Alta/muito alta	Minutos/horas	Médio
Decomposição de gás	5-50 nm	Estreita	Bom	Complicada, vácuo/atmosfera controlada	Muito alta	Minutos	Alto/escalável
Sol-gel	3-150 nm	Estreita/Larga	Bom	Simples	20-90°C	Horas/dias	Médio
Co-precipitação	10-50 nm	Larga/estreita	Pobre	Muito simples	20-90°C	Minutos	Alto/escalável
Decomposição termal	2-20 nm	Muito estreita	Muito bom	Complicado, atmosfera inerte	100-330°C	Horas	Alto/escalável
Microemulsão	4-15 nm	Estreita	Bom	Complicado	20-70°C	Horas/dias	Baixo
Hidrotermal	10-150 nm	Estreita	Muito bom	Simples, alta pressão	>100°C	Horas/dias	Médio

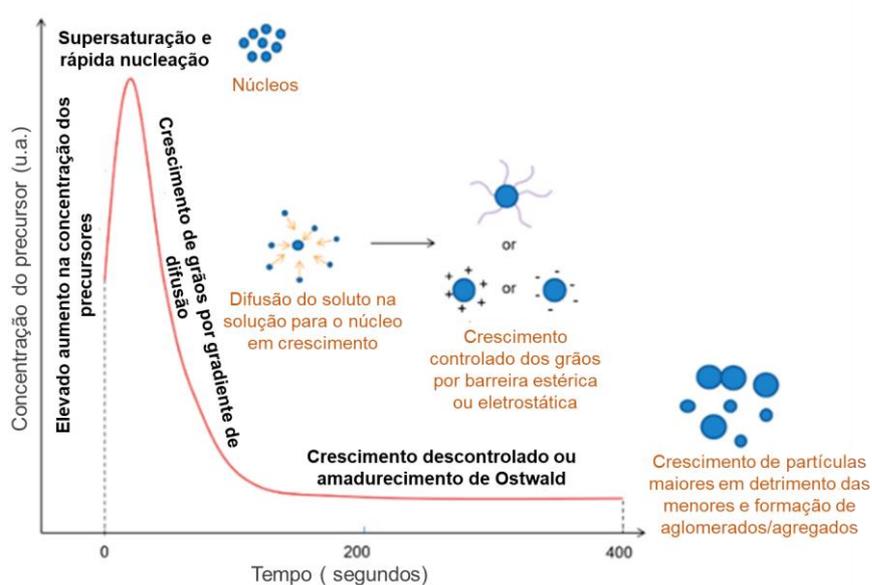
Fonte: Adaptado de Varanda (2019, p.402)³³

A metodologia utilizada nesse trabalho é a redução-precipitação, adaptada pelo nosso grupo de pesquisa³⁴ à partir do trabalho de Qu *et al.* (1999)³⁵. As nanopartículas de magnetita esferoidais, com diâmetro médio aproximado de 15 nm, são obtidas pela redução parcial *in situ* do cloreto férrico a sais ferrosos em meio aquoso, utilizando sulfito de sódio como agente redutor antes da alcalinização com hidróxido de sódio. SPIONs obtidos por esse método são estreitamente dependentes da estequiometria inicial $R_0 = [\text{Fe}^{3+}]_0 / [\text{SO}_3^{2-}]_0$, com a razão apropriada igual a três. A concentração e proporção dos reagentes de partida, são relevantes para obtenção de um sistema monodisperso.

Um mecanismo de duas etapas para preparação de partículas em solução foi proposto por LaMer³⁶⁻³⁹. A primeira etapa ocorre pela formação rápida e homogênea de núcleos, onde a concentração dos reagentes é determinante para atingir o estado crítico de supersaturação³³. Os núcleos são formados por colisões de íons e/ou moléculas conhecido como autonucleação³⁷. O processo é considerado endotérmico, pois a tensão de superfície para formação dos núcleos consome energia³⁹. A segunda etapa consiste no crescimento lento das partículas, controlado pelo transporte de massa, por meio de adição e/ou remoção de monômeros individuais de superfície até atingir o equilíbrio³³, em um processo exotérmico. Nessa etapa ocorre a formação de clusters (aglomerados) de monômeros, que aumentam gradativamente até atingir um tamanho crítico. A energia de ativação torna-se elevada e os clusters ficam confinados em uma estrutura bem definida, denominada semente, que continuam crescendo até

a concentração de sais da solução diminuir e atingir uma concentração de solubilidade de nanocristais³⁷. Em consequência da relação volume/superfície, a força motriz para remover um monômero da superfície aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, portanto, em uma solução contendo partículas de tamanhos relativamente diferentes, as partículas maiores irão crescer em virtude da solubilização de partículas menores, até obter um sistema monodisperso, como esquematizado na Figura 11. Esse processo é conhecido como amadurecimento de Ostwald, e é energeticamente favorável por buscar obter um sistema homogêneo³³.

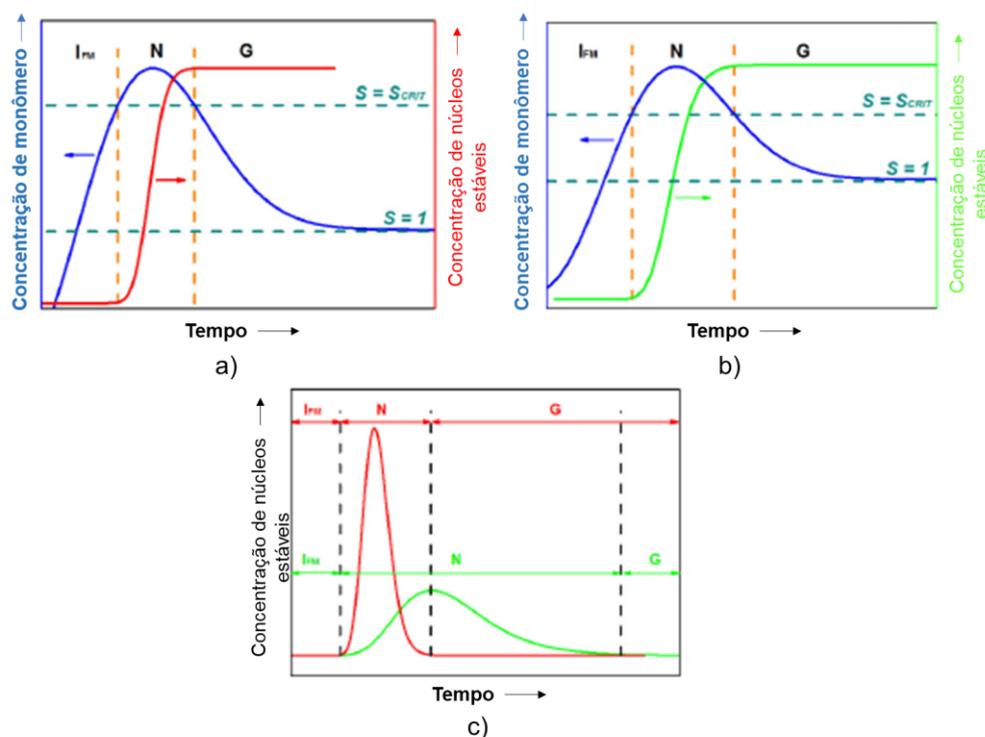
Figura 11- Etapas de formação das nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Wallyn (2019, p.15)³⁹

Para obter sistemas monodispersos, requer-se que a etapa de nucleação ocorra separadamente da etapa de crescimento. Na Figura 12a e 12b, podemos observar que a concentração de núcleos estáveis está relacionada com o tempo (dN/dt) necessário para atingir a saturação crítica (S_{CRI}). Quanto mais rápido ocorre esse processo, mais núcleos homogêneos são formados efetivamente, favorecendo a formação de sistemas monodispersos e evitando que nucleações secundárias ocorram na etapa de crescimento. Entretanto, se o processo acontecer de forma lenta, a nucleação pode percorrer durante a etapa de crescimento, aumentando a distribuição de tamanho das partículas, e o sistema torna-se polidisperso, como mostrado na Figura 12c.

Figura 12 – a) processo de nucleação rápida, b) processo de nucleação lento, c) dependência do tempo com a distribuição de núcleos estáveis uniformes relacionado aos diagramas a) e b). (I_{FM} = introdução, N= nucleação, G= crescimento, S= saturação, S_{CRIT} = saturação crítica).



Fonte: Adaptado de Varanda (2019, p.5)³⁸

1.4. Estabilidade Coloidal

Os colóides são definidos como mistura heterogênea, na qual possui ao menos uma fase distinta (sólido, líquido ou gás). Um sistema coloidal é formado por um ou mais componentes que contêm ao menos uma de suas dimensões entre 1 a 10^3 nm. Tamanho suficiente para que exista uma separação definida entre as partículas, chamada de fase dispersa, e o meio de dispersão, denominada fase contínua^{40,41}. Dispersões de partículas coloidais tendem a manter movimento de agitação constante, conhecido como movimento browniano, promovido pelo choque entre partículas e moléculas do solvente, as quais se movem por agitação térmica. O choque entre partículas ocasionado por essa movimentação, pode provocar interações entre elas, que serão responsáveis pela sua estabilidade ou agregação.

Atrações do tipo van der Waals entre as partículas de uma suspensão são as principais interações responsáveis pela formação de agregados. Por outro lado, a estabilidade acontece por interações repulsivas entre duas superfícies com cargas iguais, como também pela afinidade partícula-solvente. O processo de estabilização por afinidade partícula-solvente é decorrente de processos mecânicos, ocasionando

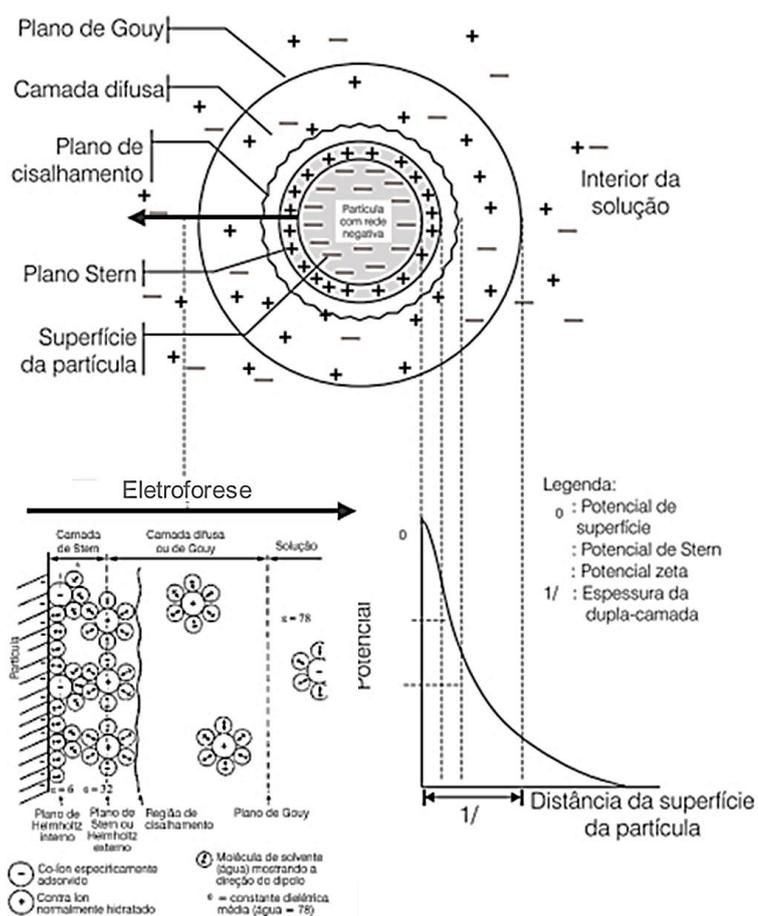
uma variação positiva de energia de solvatação. Uma alternativa para melhorar a estabilidade de partículas em uma dispersão coloidal, é o processo de adsorção de polímero na superfície de partículas, resultando em um aumento da afinidade partícula-solvente. Entretanto, outros tipos de interações entre os polímeros também poderá ocasionar a agregação dessas partículas⁴⁰.

Para que as partículas sejam biocompatíveis e atinjam o objetivo da aplicação biomédica, elas devem permanecer estáveis no sistema, evitando a formação agregados³¹. Para isso, existem técnicas capazes de avaliar as propriedades físico-químicas do material, os efeitos de superfície das partículas e sua relação com a estabilidade coloidal. A carga de superfície e o tamanho das partículas, são as principais propriedades responsáveis por diferentes efeitos na aplicação de nanopartículas na área de biomedicina, como a absorção celular, toxicidade e dissolução⁴². A carga de superfície é caracterizada pela medida de potencial zeta (ζ), também conhecida como potencial eletrocinético, na qual se estima o potencial no plano de cisalhamento de uma partícula coloidal conforme se movimenta em direção ao eletrodo oposto (eletroforese), pela aplicação de um campo elétrico⁴². Quando as partículas coloidais entram em contato com solvente polar, adquirem cargas elétricas na superfície por diferentes mecanismos como: ionização, adsorção de íon ou dissolução de íons^{40,41}. Pode-se dizer que as propriedades elétricas da superfície dos colóides é regida por interações repulsivas coulombianas⁴¹.

A presença de íons na solução aquosa em que as partículas estão dispersas, influenciará na carga da superfície e conseqüentemente no comportamento da dispersão aquosa. Os íons poderão ser atraídos ou repelidos por contra-íons ou co-íons, caso possuam cargas opostas ou cargas iguais, respectivamente. Essa distribuição de cargas (superfície da partícula e contra- ou co-íons), somado a presença de um solvente polar (meio de dispersão) que se distribui de maneira difusa, forma a dupla camada elétrica⁴⁰. A diferença entre o potencial da dupla camada elétrica das partículas eletroforicamente móveis e a camada de solução dispersante ao redor do plano de cisalhamento, resulta em diferentes potenciais, que é caracterizado pela medida do potencial zeta⁴², demonstrado na Figura 13. Conforme aumenta a força iônica da dispersão coloidal, ocorrerá a compactação da dupla camada elétrica, por causa da concentração de íons e, conseqüentemente, uma rápida diminuição do potencial de interface entre partícula e o seio da solução. Além

da força iônica, outras propriedades irão interferir na composição da camada difusa, como, pH, concentração, temperatura, etc.⁴².

Figura 13 – Representação da distribuição de cargas na superfície da partícula e no meio de dispersão, formando a dupla camada elétrica, e seus respectivos potenciais na interfase sólido-líquido.



A caracterização de espalhamento de luz dinâmica (do inglês *dynamic light scattering*, DLS), detecta a intensidade da luz espalhada pela incidência de um laser em uma dispersão coloidal. As partículas estão dispersas e em constante movimento na solução, provocando interferências construtivas e destrutivas na flutuação da intensidade da luz, correlacionada há um período de tempo de decaimento (T). Para partículas monodispersas^{42,43}, a função de correlação é obtida pela Equação 1:

$$G(T) = 1 + b \cdot e^{-2D_t T q^2} \quad \text{Equação 1}$$

onde, b é uma constante dependente das configurações ópticas, D_t é o coeficiente translacional e q é o vetor de espalhamento, descrito pela Equação 2:

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad \text{Equação 2}$$

sendo, n_0 o índice de refração do solvente, λ_0 o comprimento de onda no vácuo e θ o ângulo de espalhamento. A intensidade pode ser descrita com a função de correlação ao quadrado, conforme apresentada na Equação 3:

$$G_2(T) = 1 + G_1(T)^2 \quad \text{Equação 3}$$

O cálculo da medida do DLS é dado por uma função de correlação bruta (RCF) pelo tempo de atraso, presente na Equação 4:

$$RCF = G_2(T) - 1 = G_1(T)^2 \quad \text{Equação 4}$$

Para partículas esféricas sólidas, o raio hidrodinâmico pode ser calculado pela equação Stokes-Einstein, como mostrado na Equação 5:

$$Dt = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Equação 5}$$

onde, k_B é a constante de Boltzmann ($1,38064852 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T a temperatura, η a viscosidade absoluta e R_H o raio hidrodinâmico.

Na suspensão coloidal, as partículas estão em constante movimentação aleatória e translacional, como também rotacionando rapidamente. À medida que aumenta a concentração da dispersão, o choque entre as partículas acontecerá com maior frequência, influenciando nas interações de atração e repulsão entre elas, delimitando o comprimento médio do caminho percorrido. Conforme as partículas se deslocam no meio de dispersão, arrastam consigo moléculas de solvente que estão adsorvido na superfície, por afinidade partícula-solvente, na mesma velocidade de difusão. Portanto a medida de DLS não mede o tamanho real da partícula, mas um tamanho indicativo do coloide, formada pela partícula mais a camada de hidratação/solvatação, chamado de raio hidrodinâmico (R_H) ou diâmetro Hidrodinâmico (D_H), que depende da natureza do solvente, força iônica do meio, tamanho das partículas/moléculas no meio, concentração, carga da partícula etc^{42,44,45}.

1.5. Modificação e funcionalização de superfície de nanopartículas

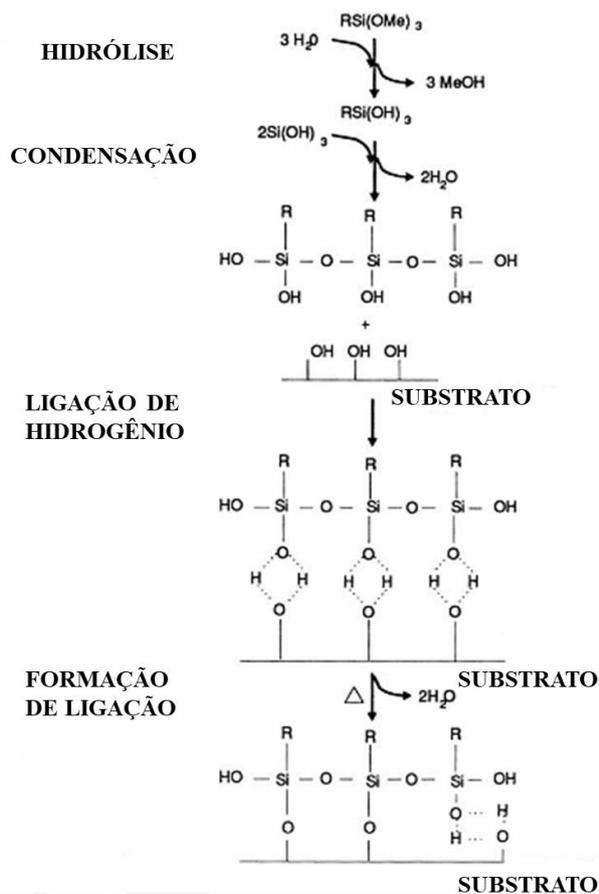
A elevada razão área de superfície/volume dos SPIONs, faz com que eles tendam a agregar para diminuir a energia de Gibbs de superfície e a atração magnética interpartículas, podendo intensificar tal agregação^{46,47}. Entretanto, a rápida

reversão de orientação em relação ao campo magnético externo aplicado e a ausência de magnetização remanente relativas ao comportamento superparamagnético, minimizam os efeitos atrativos quando em suspensões. Outros problemas, como a perda da estabilidade e a possível oxidação da superfície das partículas pode levar à complicações em relação as suas propriedades e aplicações⁴⁸.

A carga presente na superfície das nanopartículas de óxido de ferro permite a fixação de moléculas de cadeia curta, que irão manter o raio hidrodinâmico pequeno, melhorar a hidrofiliabilidade, além de não alterar as propriedades magnéticas do material de partida. Há diversos estudos e estratégias para proteção e estabilização da superfície dos coloides magnéticos, onde essas pequenas moléculas podem se ligar na superfície das partículas via coordenação ou troca de ligantes. Comumente são utilizadas moléculas que possuem forte força de ligação, como ácido carboxílico, catecol, citrato, sulfato e fosfato, ou polímeros que promovam uma ligação covalente com a superfície das nanopartículas, como o poli(etilenoglicol) (PEG) ou a polietilenoimina (PEI)⁴⁹. Uma alternativa de recobrimento com moléculas curtas são os alcossilanos ou organossilanos. A parte inorgânica da molécula pode se ligar à superfície dos SPIONs por reação de hidrólise e condensação. Por haver diferentes possibilidades de grupos terminais na parte orgânica como, aminas, tióis, cloretos, sulfonilas, a funcionalização também permite aos compostos agirem como intermediários em etapas posteriores de funcionalização. Na funcionalização, a ancoragem de medicamentos, espécies para reconhecimento celular e internalização ou formação de ligações cruzadas (*cross-link*) entre substratos inorgânicos e polímeros orgânicos, permite criar plataformas multifuncionais⁵⁰⁻⁵². Assim, além de conferir maior estabilidade, esses agentes de superfície promovem a biocompatibilidade e são facilitadores de funcionalizações adicionais para a utilização dessas plataformas no tratamento e diagnóstico (plataformas teranósticas) de doenças, como por exemplo, câncer por hipertermia magnética^{2,35}.

A inserção dos organossilanos é baseada nos processos de hidrólise e condensação. Primeiramente, os organossilanos realizam hidrólise, iniciando uma cascata de reações, como mostrado na Figura 14. Os grupos alcóxi hidrolisam e formam espécies silanóis, que são altamente reativas⁵³ e irá se ligar covalentemente na superfície das partículas de óxido de ferro formando a ligação Fe-O-Si⁵⁴.

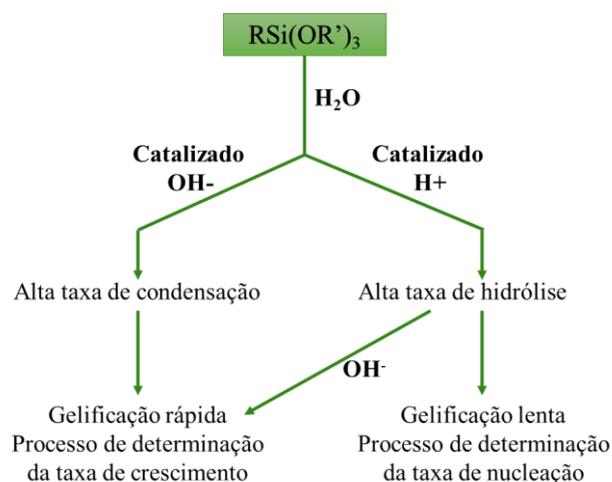
Figura 14 – Reação de hidrólise e condensação de alcoxissilanos na superfície de um substrato.



Fonte: Adaptado de Arkles (1992, p.2)⁵³

A maioria dos silanos se encontra na forma monomérica estável, porém, devido sua alta reatividade, podem hidrolisar durante a preparação ou na presença da umidade atmosférica, conduzindo a condensação entre silanóis ou com alcoxissilanos antes de se ligarem à superfície das partículas e, conseqüentemente, irá diminuir a reatividade intrínseca, reduzindo a solubilidade em soluções aquosas e formando subprodutos indesejáveis. Usualmente as metodologias utilizadas para recobrimento com alcoxissilanos, requerem o uso de um catalisador que irá iniciar a hidrólise desses silanos, porém também influenciarão a condensação do silanol e a interação com o substrato. Portanto, a cinética de reação dos silanos é dependente do pH do meio de reação (Figura 15), e determinará a etapa limitante de hidrólise ou condensação^{53,55,56}.

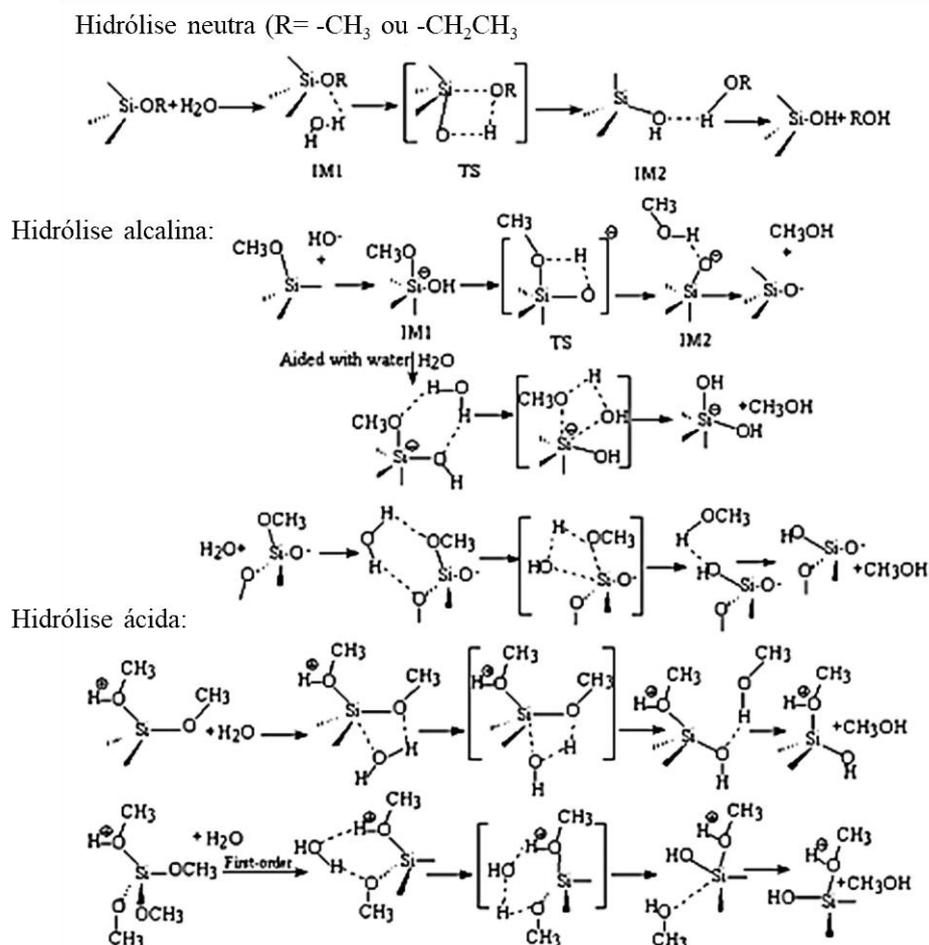
Figura 15 – Efeito do pH na hidrólise dos alcoxissilanos.



Fonte: Adaptado de Arkles (1992, p.4)⁵³

Em meio ácido, a hidrólise ocorre rapidamente, por meio de um mecanismo SN_2 em alcoxissilanos protonados, e é dependente do grupo de saída (taxa de hidrólise diminui na ordem $MeO \rightarrow EtO \rightarrow MeOCH_2CH_2O-$)^{56,57}. Entretanto, a taxa de condensação é muito lenta⁵³. Devido a hidrólise rápida em meio ácido, pode acontecer o crescimento descontrolado da cadeia polimérica, permitindo a condensação de silanos parcialmente hidrolisados antes da hidrólise completa, interferindo na reatividade dos silanóis disponíveis para ligar na superfície das partículas⁵⁶. Em meio neutro, o mecanismo é SN_1 ⁵⁵, e a cinética de hidrólise e de condensação são minimizadas, demonstrando a importância da presença de catalisadores no meio de reação^{55,56}. Em meio alcalino, ocorre o inverso da cinética ácida, a taxa de hidrólise é lenta e a de condensação é rápida^{56,57}, e o mecanismo de reação é de deslocamento nucleofílico bimolecular ($SN_2^{**}-Si$), com um intermediário pentacoordenado⁵⁵⁻⁵⁷. Na Figura 16 estão representadas as hidrólises em meio ácido, neutro e básico.

Figura 16 – Mecanismo de hidrólise em diferentes meios (TS= estado de transição, IM= intermediário).



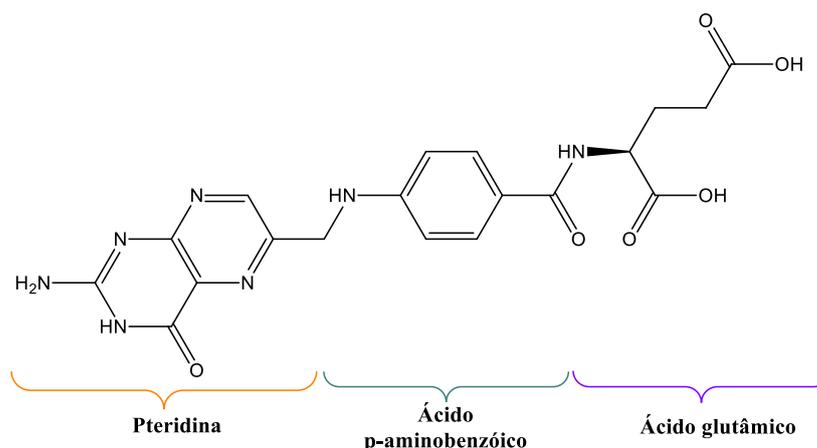
Fonte: Adaptado de Issa (2019, p.4)⁵⁵

Para obter um controle inerente e melhorar a reprodutibilidade, outras condições podem acarretar uma melhor interação silano e superfície da partícula. A quantidade de água é importante para a polimerização dos silanos até um certo limite, pois a adição de mais água, poderá inibir a reação em razão da solubilidade dos alcoxissilano⁵⁵. Solventes hidrofílicos e próticos (álcool), catalisa a cinética de hidrólise e condensação, porém dependendo da quantidade, podem interferir na reatividade, competindo com silanos por grupos de silanol de superfície ou formando complexos estáveis com espécies hidrolisadas. Outro fator determinante nas taxas de hidrólise e condensação é a temperatura, embora aumente a cinética de condensação, pode levar à formação de agregados de silano na solução ou favorecer a policondensação, onde oligômeros formados no meio ligam-se a grupos silanóis na superfície da partícula. O processo leva à impedimento estérico dificultando a modificação por novos grupos silanóis, e contribuindo para perda de estabilidade das partículas. A

presença de alguns grupos funcionais nos organossilanos permitem outros tipos de interações, e dependendo das condições de reação, favorece a agregação ou melhoram a estabilidade coloidal⁵⁸. O grupo amina, possui um caráter nucleofílico, sendo capaz de realizar interações de hidrogênio, contribuindo para formação de policamadas, podendo levar a formação agregados. O grupo tiol, dispõe de caráter eletrofílico, e sua forma aniônica desprotonada, pode estabilizar as partículas por repulsão eletrostática, entretanto, são facilmente oxidados, formando a ligação covalente estável de dissulfeto.

SPIONs nús apresentam maior toxicidade *in vitro* e *in vivo*, portanto estratégias de preparação de superfície são fundamentais para aplicações em sistemas biológicos. A modificação de superfície dos óxidos de ferro é essencial para proteger as partículas de formarem agregados, melhoram a dispersão, e preparam as partículas para conjugação de outras moléculas, tornando-as funcionais, permitindo o direcionamento de fármacos, a seleção de células específicas para menor citotoxicidade e maior biocompatibilidade²⁹. O ácido fólico é muito utilizado para a bio-funcionalização de superfície dos SPIONs. É uma molécula de vitamina do complexo B, hidrossolúveis, precursor da síntese do DNA e RNA e responsável pelo crescimento e divisão celular⁵⁹⁻⁶¹. Sua estrutura é composta pelos grupos pteridina, ácido p-benzóico e o ácido glutâmico, como apresentado na Figura 17. As células cancerígenas possuem uma elevada quantidade de receptores folatos, o que as diferenciam das células normais⁶². O ácido fólico é estável, não imunogênico, possui cadeia curta e baixo valor comercial⁶³, pode-se ligar covalentemente via grupo γ -carboxílico à superfície de nanopartículas modificada, formando uma ligação amida, semelhante a uma ligação peptídica. No sistema intravenoso, essas ligações só podem ser clivadas sob condições específica de pH e presença de enzima contidas nos receptores folatos, em maior número nas células cancerígenas, não prejudicando células normais^{51,63,64}. Ainda, a molécula do ácido fólico pode ser previamente modificada inserindo o grupo tiol terminal, que pode ser utilizado para promover a formação de ligação dissulfeto com o grupo tiol terminal de alguns silanos.

Figura 17 – Estrutura do ácido fólico.



Fonte: Autoria própria

1.6. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas

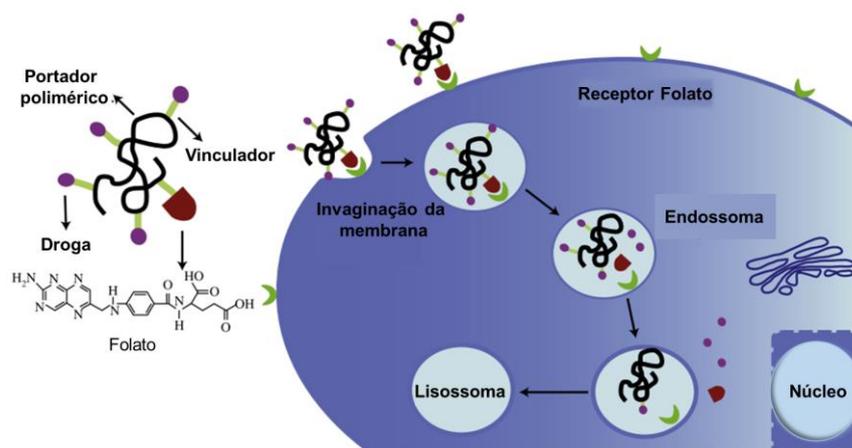
Terapia teranóstica permite a combinação de agentes terapêuticos e de diagnósticos em uma única plataforma, para aplicações na área biomédica^{29,65,66}. SPIONs multifuncionais e biocompatíveis são ferramentas essenciais para combinar duas ou mais modalidades de imageamento, ou terapias simultâneas, com objetivo de superarem as dificuldades de terapias tradicionais invasivas. As nanopartículas superparamagnéticas estão sendo amplamente estudadas para aplicações no tratamento de câncer, devido suas propriedades singulares, como a capacidade de aumentar o relaxamento de prótons na presença de um campo magnético externo, a possibilidade de ancorar diferentes grupos funcionais biocompatíveis, *design* adaptado para segmentação celular, dentre outros²⁹. Os desafios encontrados para aplicação das nanopartículas teranósticas é o direcionamento de novos biomarcadores, investigação da toxicidade e citotoxicidade inerente dos componentes presente nos nanomateriais, estudo da estabilidade, custo e controle na produção⁶⁶.

O diagnóstico através de imageamento por ressonância magnética (MRI) é uma técnica não invasiva de imagem transversal, molecular e celular, de tecidos moles ou órgãos, com alta resolução^{29,67,68}. A água presente no corpo é fundamental para obter as imagens por ressonância magnética. Os núcleos de hidrogênio presentes na água tendem a alinhar-se em uma direção paralela ao campo magnético externo aplicado. Em seguida, é utilizado pulsos de radiofrequência (RF), que irá realinhar o direcionamento dos núcleos de hidrogênio. Ao término da aplicação da RF, esses prótons retornam ao alinhamento original paralelo ao campo magnético externo aplicado, e o processo de relaxamento libera energia, que pode ser detectado pelo

equipamento e produz a imagem. Os tempos de relaxação para que os spins realinhem e retorne ao seu estado de equilíbrio térmico original, são denominados T1 (longitudinal – relaxação de spin-rede) e T2 (transversal – relaxamento de spin-spin). A relaxividade está relacionada com o campo magnético externo aplicado, e é o inverso dos tempos de relaxação nas respectivas direções longitudinal e transversal, $r_1 = 1/T_1$ e $r_2 = 1/T_2$, e estão associados a contrastes positivos e negativos^{66,67}. SPIONs são eficientes agentes de contraste de MRI, visto que os parâmetros T1 e T2 são dependentes da magnetização de saturação das nanopartículas, na qual interagem magneticamente com os prótons de água, encurtando os tempos de relaxação e aumentando a relaxividade, melhorando o contraste e a diferenciação entre os tecidos^{29,65-67}.

SPIONs teranósticos para sistemas de entrega de drogas com seletividade para sítios patológicos, são amplamente estudados para o tratamento do câncer, visto que tratamentos convencionais, como quimioterapia, ainda apresentarem limitações na distribuição dos medicamentos⁶⁵. Uma das desvantagens dos tratamentos quimioterápicos é a baixa seletividade, afetando também células saudáveis. Outro problema está relacionado ao comportamento químico das moléculas, na qual a droga utilizada precisa ter caráter hidrofílico para percorrer o sistema circulatório até chegar à superfície da célula tumoral, como também requer caráter hidrofóbico para penetrar a célula cancerosa, que possui uma camada lipídica. Porém, há um impasse no momento de conciliar essas duas propriedades em uma mesma molécula de medicamento⁶⁴. Nanopartículas magnéticas funcionam como carreadoras de fármacos, ao aplicar o campo magnético externo, as nanopartículas magnéticas tendem a se direcionar e concentrar no lugar destinado⁶⁵. As células cancerígenas possuem inúmeros receptores folatos em sua superfície celular, portanto é importante que os carreadores possuam moléculas de fármaco com alta especificidade de células tumorais. Para isso, o sistema depende de interações reversíveis entre o carreador e a droga, e interações covalentes entre a droga e o receptor, uma vez que o medicamento entra na célula de câncer por endocitose mediada por receptor^{64,65}, como está ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Sistema de entrega de drogas e processo de endocitose de receptor folato.



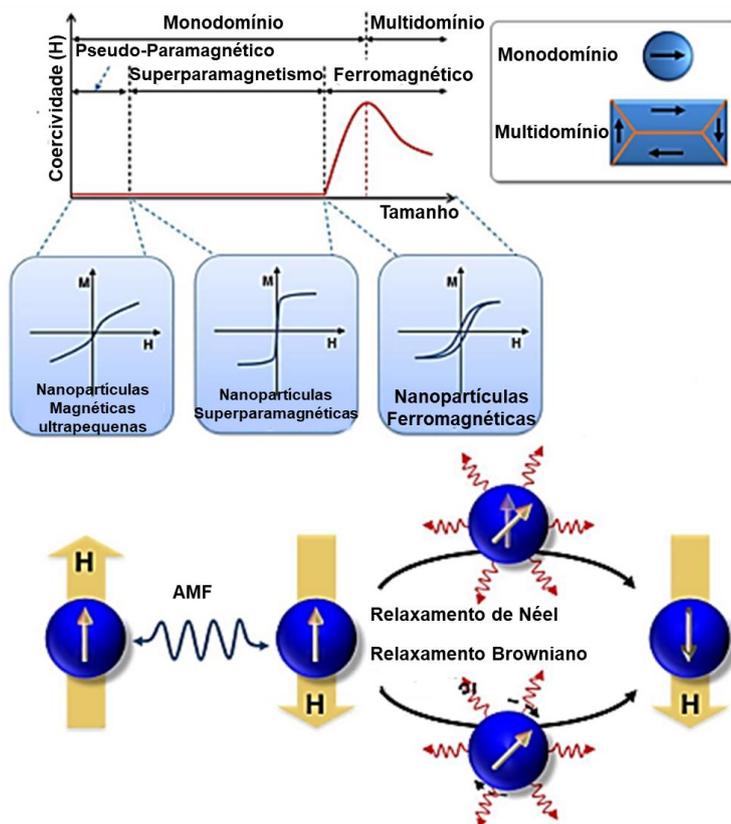
Fonte: Adaptado de Walters (2013, p.3)⁶⁹

A terapia por hipertermia promove o aquecimento dos tecidos tumorais, com interesse em danificá-los e matar as células cancerosas. Também podem torna-las sensíveis para outros tratamentos, considerando que algumas células de câncer são resistentes ao uso de radiação ou outros tratamentos com medicamento, porém são muito sensíveis ao calor. Há três principais tipos de tratamento⁷⁰: (i) Hipertermia local, aplicada em pequenas regiões, como tumores; (ii) Hipertermia regional, que abrange uma área maior, como órgãos, tecidos, cavidades tumorais ou membros, e (iii) Hipertermia de corpo inteiro, utilizada quando o câncer espalhou por grandes regiões (câncer metastático).

Os SPIONs possuem momentos magnéticos que não são cancelados, resultando em uma forte magnetização espontânea⁷¹. No processo de hipertermia, a suspensão de SPIONs é submetida a um campo magnético externo alternado em uma frequência apropriada para promover a reversão do momento magnético da partícula e os processos de relaxação levam à liberação dessa energia na forma de calor, induzindo a apoptose celular ao redor de 42 °C para células tumorais. Células saudáveis são preservadas, uma vez que as mesmas iniciam a apoptose em temperaturas mais elevadas, ao redor de 46-47 °C⁷². Temperaturas muito elevadas podem ser prejudiciais, causando a desnaturação de proteínas, alterando a estrutura do citoesqueleto, afetando os processos de reparação de DNA, modificando a permeabilidade da membrana celular e estimulando o sistema imunológico. Em contrapartida, na temperatura de 42°C, necessária para apoptose das células de câncer, acontece processos favoráveis, como aumentar o fluxo sanguíneo para região do tumor e melhora na permeabilidade celular, favorecendo potencialmente a entrada

de nutrientes e oxigênio nas células tumorais⁷³. O calor pode ser originado por dois principais mecanismos: perda de histerese e perdas por relaxação⁷¹. Na Figura 19, temos exemplo do aquecimento por perda de histerese, relaxamento de Néel e Browniano.

Figura 19 – Representação dos *loops* de histerese para nanopartículas pseudo-paramagnética, superparamagnética e ferromagnéticas, e os relaxamentos de Néel e Browniano.



Fonte: Adaptado de Liu (2020, p.3796)⁷⁴

A perda por histerese ocorre em partículas de multidomínios, na qual seus momentos magnéticos são orientados em direção do campo magnético externo, ao inverter a direção do campo aplicado, há uma diferença de energia (coercividade), que é liberada na forma de calor. Quando o tamanho das partículas é inferior ao tamanho crítico, elas exibem um único domínio, e o seu comportamento passa a ser superparamagnético (SPIONs). Quando o campo magnético alternado externo é aplicado, pode acontecer a dissipação de calor por dois tipos de relaxamento: Néel e Browniano. No primeiro, os momentos magnéticos das partículas rotacionam para uma orientação próxima a do campo, sem que haja a rotação da partícula, e ao retornarem ao seu estado de equilíbrio, relaxam e a energia é convertida em forma de

calor. O segundo é resultante da fricção originada da rotação da partícula com o fluido do meio onde se encontram, sendo dependente do volume hidrodinâmico e a viscosidade da solução^{65,70,71,74}. A capacidade das nanopartículas em promover essa transformação de energia em calor por unidade de massa, é medida pelo parâmetro denominado SAR (do inglês, *Specific Absorption Rate*) ou SLP (do inglês, *Specific Loss Power*)³⁰. Para adquirir um valor confiável de SLP das curvas de aquecimento, realiza-se o ajuste de Lucas-Box, pela Equação 6⁷⁵:

$$\Delta T = \frac{Sm}{k} (1 - e^{-k(t-t_0)}) \quad \text{Equação 6}$$

onde Sm e k são parâmetros de ajuste. Sm é a inclinação inicial da curva de aquecimento e k é uma constante que descreve a taxa de resfriamento. A partir dos valores extraídos, é possível calcular o valor de SLP pela Equação 7:

$$SLP = \frac{Sm C_v}{\rho_i} \quad \text{Equação 7}$$

sendo, C_v a capacidade calorífica da solução e ρ_i a concentração em massa de metal na solução de nanopartículas⁷⁵. Para normalizar os valores de SLP, e relacionar com a eficiência na conversão de aquecimento, uma vez que as medidas podem ser realizadas em diferentes frequências e amplitudes, é utilizado o cálculo de ILP (do inglês, *Intrinsic Loss Power*)^{75,76}, utilizando a Equação 8:

$$ILP = \frac{SLP}{H^2 f} \quad \text{Equação 8}$$

onde H é a intensidade do campo (kA.m⁻¹), e f é a frequência (kHz).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho reside no estudo de condições ideais de funcionalização dos SPIONs sintetizados pelo método de “redução-precipitação” com agentes de biocompatibilização e de reconhecimento celular para aproximar e/ou internalizar as nanopartículas em células tumorais para tratamento de câncer via hipertermia magnética.

Par atingir o objetivo mencionando, algumas etapas foram como descritas a seguir:

- Sintetizar nanopartículas de SPIONs na fase magnetita com características superparamagnéticas e hipertérmicas apropriadas, através da metodologia redução-precipitação, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa;
- Modificar a superfície das nanopartículas magnéticas controlando as reações de hidrólise e condensação de diferentes organossilanos: 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) e 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS), conferindo as nanopartículas menor toxicidade e grupos terminais adequados para conjugação com moléculas funcionais;
- Adequar as condições de síntese para promover o acoplamento direto do ácido fólico no grupo terminal amino das nanopartículas funcionalizadas com APTS via formação de ligação amida (peptídica);
- Realizar a funcionalização do ácido fólico com amino-tiol acoplados à molécula, por exemplo, a cisteamina (2-aminoetanotiol), para adição de um grupo terminal do tipo tiol à molécula de ácido fólico;
- Ajustar as condições de síntese para promover o acoplamento das moléculas de ácido fólico tiol-modificadas a partir de ligação de dissulfeto com os grupos terminais tióis do MPTS antes da modificação da superfície das partículas, como também com as SPIONs previamente funcionalizadas com o respectivo silano.
- Realizar a caracterização dos sistemas, investigando a estabilidade coloidal dos diferentes sistemas e correlacionando com medidas de hipertermia magnética.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Preparação das amostras

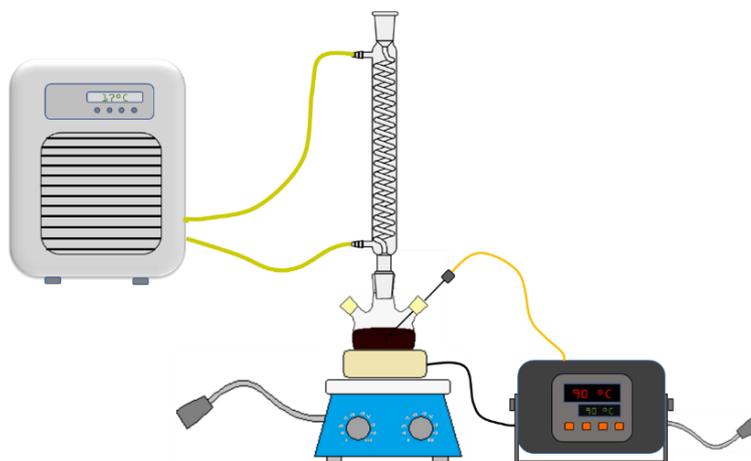
Para todos os procedimentos experimentais e análises dos sistemas foram utilizados reagentes químicos com grau analítico e sem nenhum tratamento prévio. Para as sínteses que necessitam de atmosfera foi utilizado gás nitrogênio. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (18 M Ω .cm) e/ou deionizada. Para algumas etapas de separação utilizou-se centrífuga Eppendorf 5810 R. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Aldrich, exceto a base comprado da Synth e o HCl comprado da Mallinckrodt.

3.2. Síntese dos SPIONs de magnetita em meio aquoso

A metodologia de síntese de SPIONs em sistema aquoso realizada nesse trabalho, foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa³⁴, a partir de modificações do trabalho de *Qu et al.(1999)*³⁵. A rota consiste na formação de nanopartículas de magnetita via redução controlada de íons ferro(III) a ferro(II) em meio aquoso, denominada de “redução-precipitação”. Uma das vantagens é sua simplicidade e envolver processos verdes⁷⁷ quando comparada a outros métodos de síntese dispendiosos, não necessitando de sistemas com atmosferas inertes e nem de precursores organometálicos tóxicos e caros, além do bom rendimento e considerável controle de características morfológicas.

As sínteses foram realizadas em um balão de três bocas de fundo redondo acoplado a um condensador do tipo Graham sobre uma manta de aquecimento. A temperatura de envelhecimento foi controlada por um termopar inserido na solução de reação, conectado a um controlador de temperatura microprocessado (Figura 20).

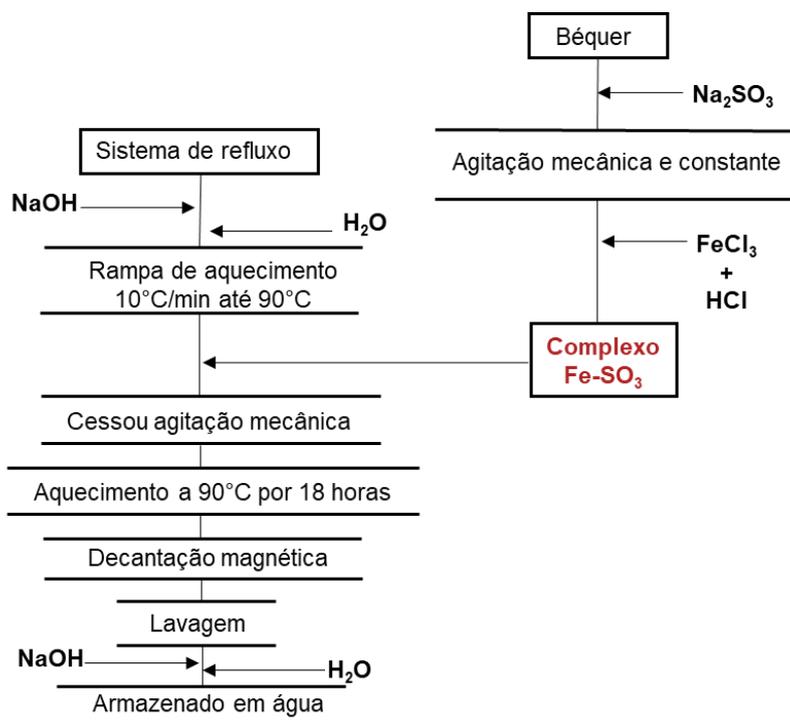
Figura 20 – Representação do sistema experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.



Fonte: Autoria própria

A metodologia utilizada para síntese dos SPIONs com tamanho aproximado de 15 nm, está esquematizada no fluxograma apresentado na Figura 21.

Figura 21 – Fluxograma do procedimento experimental da síntese dos SPIONs de magnetita em meio aquoso.



Fonte: Autoria própria

Inicialmente, duas soluções aquosas foram preparadas separadamente. Uma contendo o precursor de cloreto de ferro(III) na concentração de 1 mol.L^{-1} . As soluções de Fe^{3+} foram preparadas em meio acidificado, contendo HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, para prevenir a hidrólise descontrolada dos íons Fe^{3+} . A segunda solução, contendo íons SO_3^{2-} , foi preparada na concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de Na_2SO_3 . Uma terceira solução de 1 mol.L^{-1} de NaOH , foi preparada e o volume adicionado foi calculado para satisfazer uma quantidade de excesso de íons hidroxila na solução final ($[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$) igual a $2 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, segundo a Equação 9. O volume final para todas as sínteses realizadas neste trabalho foi fixado em 100 mL. Em um experimento típico, 3 mL da solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em meio ácido foi inicialmente misturado com 2 mL da solução Na_2SO_3 . Os volumes das soluções foram calculados para manter a concentração de íons Fe(III) na solução final ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{F}}$) igual a $3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e a quantidade de íons SO_3^{2-} satisfazendo a razão $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{F}}/[\text{SO}_3^{2-}] = 3$. Imediatamente após a mistura, a solução amarela alaranjada muda para uma cor vermelha intensa, indicando a formação de um complexo intermediário Fe-SO_3 , que gradualmente retorna para uma cor amarelo claro, indicando a formação de Fe^{2+} . Esta reação promove a redução controlada de íons Fe^{3+} para Fe^{2+} , possibilitando a formação de nanopartículas de magnetita na etapa seguinte de reação. Ao mesmo tempo, no balão de três bocas, o volume

apropriado da solução de NaOH é diluído com água até um volume de 95 mL, satisfazendo a Equação 9.

$$[\text{OH}^-]_{\text{exc}} = [\text{NaOH}] - (3 [\text{Fe}^{3+}]_{\text{total}} + [\text{HCl}])$$

Equação 9

O sistema contendo a solução alcalina foi aquecido até 90°C com a taxa de 10°C/minuto. A solução contendo o complexo Fe–SO₃ recém preparada foi injetada rapidamente no sistema contendo a base (NaOH), com a temperatura estabilizada a 90°C, para formação dos núcleos de magnetita. A reação foi deixada em aquecimento por 18 horas, a 90 °C e sem agitação, para que ocorresse o controle do processo de crescimento e o envelhecimento de Ostwald, que influencia diretamente no tamanho das nanopartículas e sua cristalinidade, resultando em materiais com propriedades magnéticas hipotérmicas melhoradas. Após o término da reação, o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e o precipitado foi lavado diversas vezes com uma solução de hidróxido de sódio diluída, a fim de tirar o excesso de sulfato na superfície da partícula, e posteriormente separado magneticamente. Por fim, as nanopartículas foram lavadas algumas vezes com água deionizada e decantadas com auxílio de um ímã (o sistema fica decantando sobre um ímã e o sobrenadante é retirado). Uma parte da amostra foi suspensa em água e uma porção foi colocada na estufa a vácuo durante 1 dia a 50°C, para que assim pudessem ser feitas todas as caracterizações necessárias com todas as amostras.

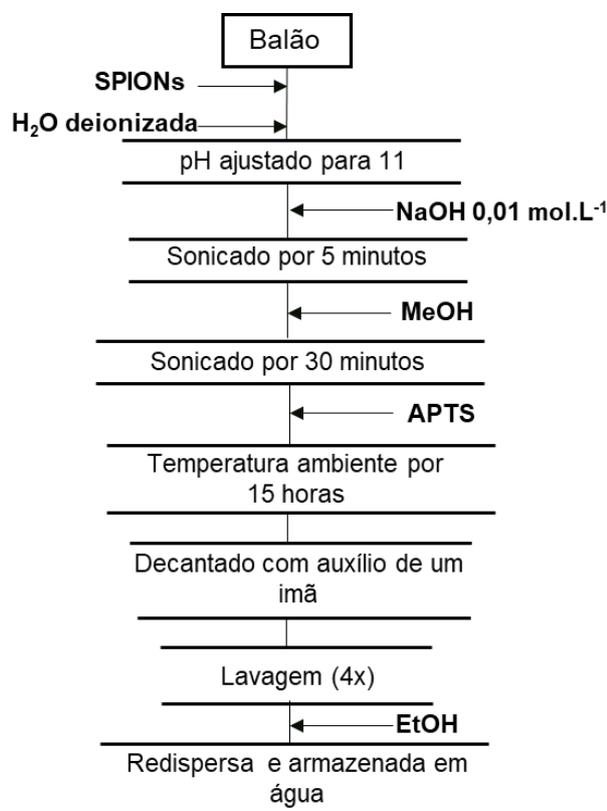
3.3. Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com diferentes alcóxissilanos

3.3.1. Modificação com 3-(aminopropil)trietóxisilano (SPION@APTS)

A superfície dos SPIONs foi modificada com 3-aminopropiltriétoxisilano (APTS) e as condições para a modificação foram ajustadas para que os silanos se liguem diretamente às nanopartículas individuais e não formem uma matriz de sílica recobrendo diversas partículas ao mesmo tempo. O procedimento de funcionalização foi adaptado do trabalho de Marciello et al.(2013)⁷⁷, representado no fluxograma na Figura 22. Em um balão de três bocas foi adicionado a suspensão aquosa contendo 10 mg de SPIONs, e completado o volume para 5 mL com água deionizada. O pH foi ajustado para 11 com solução de hidróxido de sódio 1x10⁻² mol.L⁻¹ e sonicado por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de metanol, de tal forma que a proporção água/metanol fosse 1:1 (v/v), e a suspensão foi sonicada por mais 30 minutos para

que houvesse uma dispersão homogênea das partículas e o recobrimento fosse realizado individualmente, evitando a formação de aglomerado. Por fim, mantendo uma proporção SPIONs/APTS de 1:2 (m/m), adicionou-se gota a gota 21 μL de APTS ($d=0,946 \text{ g.mL}^{-1}$). A síntese ocorreu por 15 horas em temperatura ambiente e com leve agitação mecânica para evitar a aglomeração das nanopartículas. O produto formado foi lavado 4 vezes com etanol e decantado com auxílio de um imã, com a remoção do sobrenadante. Ao término das lavagens com etanol, o residual de solvente foi evaporado com ar comprimido, e as nanopartículas magnéticas recobertas com APTS foram redispersas novamente em água deionizada e armazenada para posteriores análises. Sabe-se que há fatores que interferem diretamente nas reações de hidrólise e condensação dos silanos para recobrimento em superfície de nanopartículas como temperatura, tempo de reação, pH, concentração de silano, solvente^{55,78,79}, portanto, foram realizadas diferentes sínteses para recobrimento com APTS, variando-se pH e concentração de silano, que serão discutidas posteriormente.

Figura 22 - Fluxograma do procedimento experimental do recobrimento da superfície dos SPIONs com 3(aminopropil)trietóxisilano.

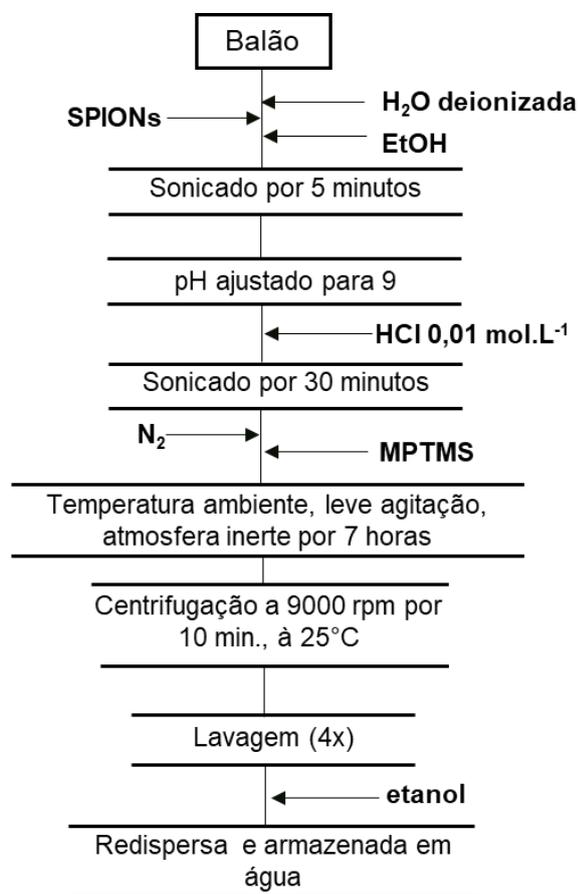


Fonte: Autoria própria

3.3.2. Modificação com 3-(mercaptopropil)trimetóxisilano (SPION@MPTMS)

Este procedimento foi adaptado do trabalho de Pallavicini⁸⁰ e está representado no fluxograma presente na Figura 23. Em um balão de três bocas, adicionou-se 10 mg de suspensão de SPION, 10 mL de água destilada, 20 mL de etanol e dispersada em um banho de ultrassom por 5 minutos. O pH inicial da solução é de 10,0, e foi ajustado para 9,0 utilizando HCl 0,01 mol.L⁻¹ e sonicado em um banho de ultrassom por mais 30 minutos. Posteriormente, saturou o balão de gás N₂, e com agitação mecânica foi adicionado gota a gota 10, 20 e 30 µL MPTMS (95%, Sigma-Aldrich, d=1,057 g.mL⁻¹). A reação ocorreu em temperatura ambiente, com leve agitação mecânica e atmosfera inerte por 7 horas. O produto foi lavado quatro vezes com etanol e separado por centrifugação (9000 rpm, 25°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Na última lavagem o residual de solvente foi evaporado por ar comprimido, a amostra foi dispersada novamente em água e armazenada para posteriores análises.

Figura 23 - Fluxograma do procedimento experimental do recobrimento da superfície dos SPIONs com 3-(mercaptopropil)trimetóxisilano.



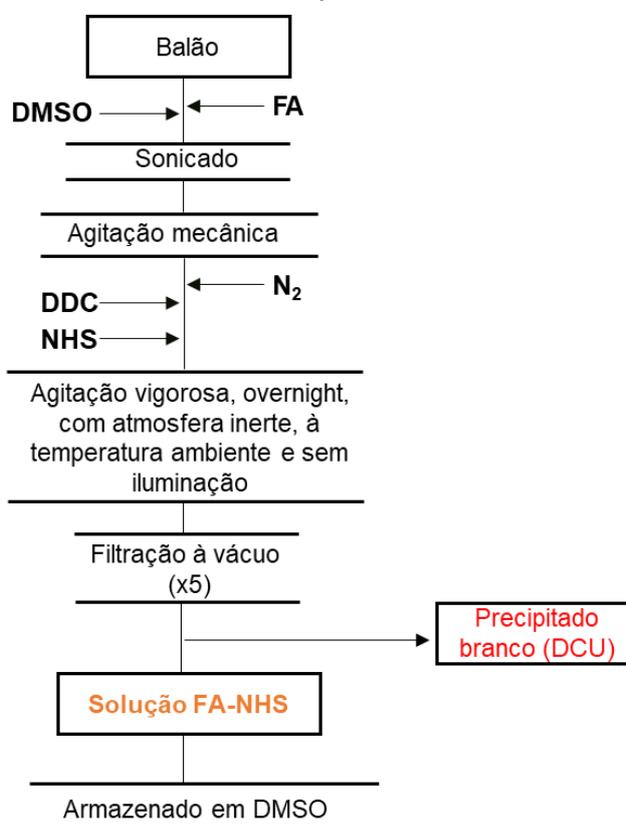
Fonte: Autoria própria

3.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico (FA)

3.4.1. Ativação do ácido fólico (FA-NHS)

A primeira etapa antes da funcionalização da superfície dos SPIONs e do acoplamento com amino- tiol, é a ativação do ácido fólico, preparado de acordo com o trabalho de Sharon (2014)⁸¹ e evidenciado no fluxograma na Figura 24. Em um balão de três bocas, 0,25 g de FA foi solubilizada em 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e sonicado em um banho de ultrassom por 45 minutos. Essa solução foi agitada magneticamente sob atmosfera de N₂ por 10 minutos. A ativação do grupo carboxilato ocorreu pela adição de 0,125 g de *N,N*-díciclo-hexilcarbodiimida (DDC, MM=206,33 g/mol) e 0,225 g de *N*-hidroxisuccinimida (NHS, MM=115,09 g.mol⁻¹) sob agitação vigorosa e constante, durante a noite, ao abrigo da luz, com atmosfera inerte e a temperatura ambiente. O precipitado branco formado é o subproduto da reação (díciclohexilureia- DCU)⁸², que foi removido por filtração a vácuo (5 vezes) e a solução laranja-avermelhada obtida é o ácido fólico ativado (FA-NHS, MM=538,47 g.mol⁻¹), que foi armazenado para ser utilizado na etapa posterior.

Figura 24 – Fluxograma do procedimento da ativação do ácido fólico via DDC/NHS.

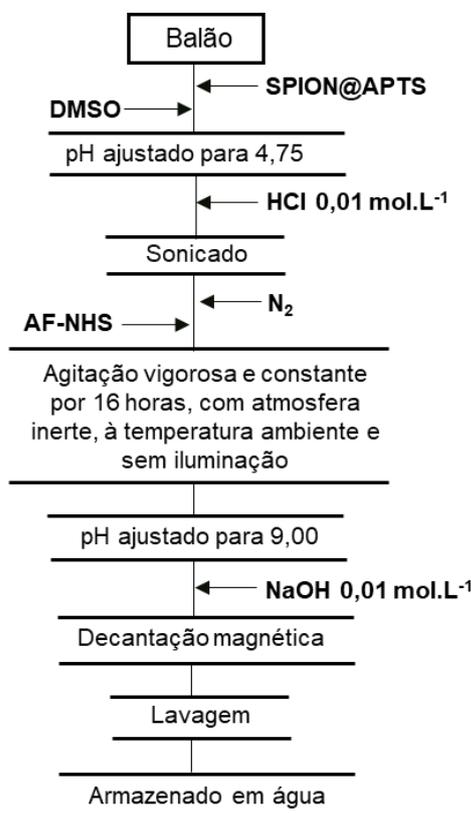


Fonte: Autoria própria

3.4.2. Funcionalização da superfície dos SPIONs recobertos com APTS (SPION@APTS@FA)

A síntese de funcionalização das nanopartículas magnéticas recobertas com APTS diretamente com o ácido fólico foi adaptada do trabalho de Alupei *et al.* (2017)⁸³ e Vortherms *et al.* (2008)⁸², o fluxograma dessa reação encontra-se na Figura 25. Em um balão de três bocas, se dispersou 2 mL da solução aquosa de nanopartículas modificadas com APTS ($3,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em 2 mL de DMSO, o pH da solução foi ajustado para 4,75 pela adição de $\text{HCl } 1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e sonicada por 10 minutos. Essa solução foi agitada magneticamente sob atmosfera de N_2 por 10 minutos. Por fim, 1 mL da solução de FA ativado (FA-NHS, $\text{MM} = 538,47 \text{ g.mol}^{-1}$) foi gotejada sob agitação magnética constante, e a reação ocorreu com ausência de iluminação, atmosfera inerte a temperatura ambiente por 16 horas. No final da reação, elevou-se o pH da solução para pH 9,0 para cessar a reação, adicionando $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. O produto foi decantado com auxílio de um ímã e lavado 4 vezes com DMSO. As nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico foram redispersas em água deionizada e armazenada para posteriores análises.

Figura 25 – Fluxograma do procedimento experimental da funcionalização com ácido fólico na superfície dos SPIONs modificado com 3-(aminopropil)trietóxisilano.

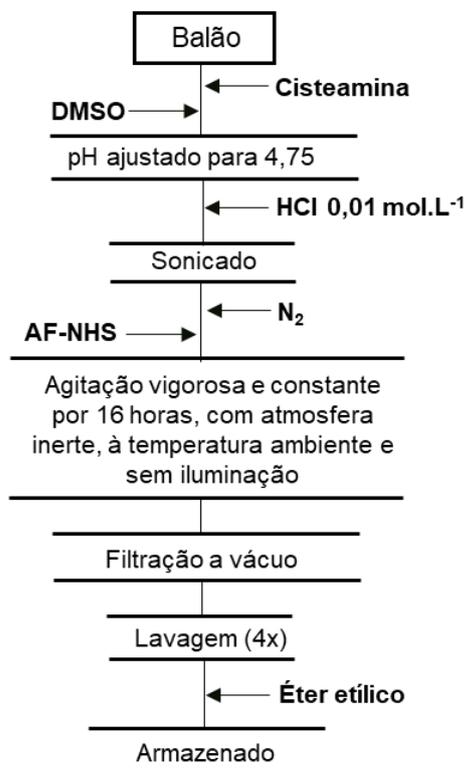


Fonte: Autoria própria

3.4.3. Preparação do conjugado cisteamina-ácido fólico (CYS-FA)

A síntese de conjugação da cisteamina com ácido fólico via ligação amida foi adaptada do trabalho de Vortherms *et al.* (2008)⁸², Alupei *et al.* (2017)⁸³ e Khademi *et al.* (2018)⁸⁴, esquematizada no fluxograma na Figura 26. Nessa etapa, 0,3 mmol de cisteamina ($MM=77,15 \text{ g.mol}^{-1}$) foi solubilizada em 10 mL de DMSO em um balão de três bocas e sonicada por 10 minutos. O pH da solução foi ajustado entre 4,5-4,75, utilizando HCl 0,01 mol.L⁻¹ e sonicado por mais 10 minutos. Posteriormente, essa solução foi levada para agitação magnética e foi saturada com gás N₂ por 10 minutos. Então, 0,1 mmol do ácido fólico ativado (FA-NHS, $MM= 538,47 \text{ g.mol}^{-1}$), preparado no item 3.4.1, foi gotejado lentamente no balão contendo a cisteamina, sob agitação mecânica constante, e a reação ocorreu com ausência de iluminação, atmosfera inerte a temperatura ambiente por 16 horas. O precipitado amarelo alaranjado (CYS-FA, $MM = 500,53 \text{ g.mol}^{-1}$) formado foi filtrado à vácuo e lavado com solução de éter etílico gelado. O pó foi seco e armazenado para análises posteriores.

Figura 26 – Fluxograma do procedimento de conjugação da cisteamina com ácido fólico via ligação amida.



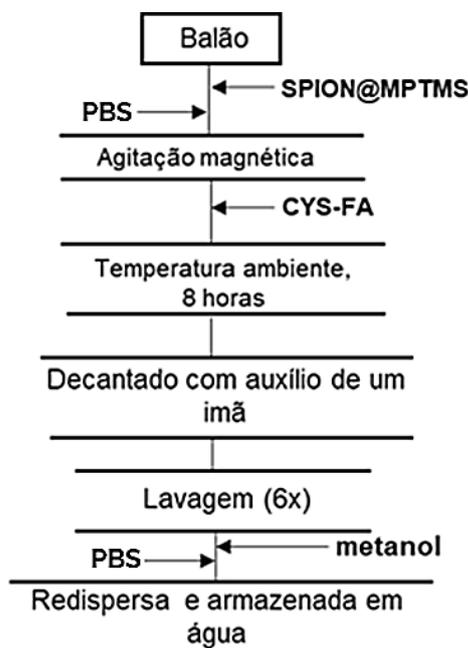
Fonte: Autoria própria

3.4.4. Funcionalização da superfície dos SPIONs recobertos com MPTMS (SPION@MPTMS@CYS-FA)

Preparo da solução tampão fosfato (PBS): Para o preparo de 500 mL de solução tampão fosfato (PBS), em um béquer adicionou-se inicialmente 480 mL de água deionizada, e os seguintes sais: 4 g de NaCl (137 mmol.L^{-1}), 0,1 g de KCl ($2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$), 0,5945 g de Na_2HPO_4 (10 mmol.L^{-1}) e 0,1 g de KH_2PO_4 (2 mmol.L^{-1}), promovendo agitação até total dissolução dos sais. Se necessário, o pH foi ajustado para 7,4 com soluções de HCl e NaOH, ambos na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Transferiu-se essa solução para um balão volumétrico, completou-se o volume com água deionizada e se manteve em repouso por um dia antes do uso.

Acoplamento do conjugado cisteamina-ácido fólico na superfície dos SPIONs recobertos com MPTMS via ligação dissulfeto: O acoplamento via ligação dissulfeto do ácido fólico modificado com amino-tiol (item 3.4.3), na superfície dos SPIONs modificados com MPTMS (item 3.3.2), foi baseado no trabalho de Mortera *et al.* (2009)⁸⁵, e está representado no fluxograma na Figura 27. Em um balão de uma boca, 8 mg da amostra de SPION@MPTMS ($1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi solubilizado em 20 mL de solução tampão fosfato (PBS). Sob agitação magnética, adicionou-se 10 mg de CYS-FA (20 mmol), e a reação ocorreu em temperatura ambiente, por 8 horas, na presença de oxigênio. O produto foi separado por decantação magnética e lavado abundantemente com metanol e SBF. A amostra foi redispersa em água deionizada e armazenada para posteriores análises.

Figura 27 - Fluxograma do procedimento experimental do acoplamento CYS-FA na superfície das SPIONS modificadas com 3-mercaptopropil-trimetóxisilano via ligação dissulfeto.



Fonte: Autoria própria

3.5. Caracterização das amostras

As amostras obtidas conforme descritas no procedimento experimental, foram analisadas e caracterizadas por diferentes técnicas, cujos equipamentos e o método de preparação das amostras estão descritos a seguir.

Difratometria de raios X (DRX): Para identificação das fases cristalográficas presentes nas amostras de magnetita e após a modificação de sua superfície, foi utilizada a técnica de difratometria de raios X. O equipamento utilizado para análise foi um difratômetro Bruker D8 Advance, operando com radiação $K\alpha$ do cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) e velocidade de varredura de $0,020^\circ/0,3$ segundos em 2θ . As amostras de nanopartículas de magnetita nuas e recobertas com silano foram preparadas gotejando a suspensão em meio aquoso sobre um substrato de silício (*zero background*), sendo o solvente evaporado à temperatura ambiente em uma estufa a vácuo.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM): Para análise das características morfológicas como, tamanho, forma, uniformidade da distribuição das nanopartículas sintetizadas e avaliação do recobrimento com organossilanos, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram dispersas em água com auxílio de um banho de ultrassom por alguns minutos, uma gota da suspensão diluída

foi adicionada às redinhas de cobre previamente revestida com o polímero Formvar® e recobertas com um filme fino de carbono por sputtering. Por fim, colocadas em um dissecador sob vácuo por dois dias para evaporação do solvente. A análise foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM 2100, operando a 200 kV. O tamanho médio das nanopartículas e a distribuição de tamanhos foram obtidos através da contagem de pelo menos 100 nanopartículas utilizando o software livre ImageJ.

Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR): A espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada para analisar a formação de óxido de ferro, pela vibração na região da ligação Fe-O, sendo possível caracterizar a fase magnetita, bem como também identificar compostos moleculares e grupos funcionais presentes na superfície dos sólidos após a funcionalização. O equipamento utilizado foi um espectrômetro IRPrestige-21 (Shimadzu), e as análises foram realizadas em pastilhas de KBr previamente seco em estufa à temperatura de 40°C em vácuo por cerca de 24 horas, e os espectros foram obtidos entre número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e acúmulo de 32 varreduras.

Magnetometria de amostra vibrante (VSM): Para avaliar o comportamento magnético das amostras, utilizou-se a técnica de MAV (ou VSM, do inglês *Vibrating Sample Magnetometry*) no Departamento de Física dos Materiais e Mecânica, do Instituto de Física de São Paulo. Utilizou-se um magnetômetro de amostra vibrante convencional e as amostras foram preparadas colocando-se uma massa conhecida da amostra (3 a 5 mg) no interior de uma cápsula de medicamento vazia, na qual foi presa por uma das extremidades no interior de um fino tubo de plástico fixado verticalmente e centralizada entre duas bobinas semicondutoras. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 e -20 kOe e as medidas realizadas à temperatura ambiente.

Hipertermia magnética: Os ensaios de hipertermia magnética foram realizados em água deionizada utilizando as nanopartículas com e sem recobrimento. A amostra foi submetida à um campo magnético de amplitude e frequência iguais a, respectivamente, 24 mT e 109,1 kHz. Para a análise, as amostras foram deixadas em repouso, para estabilizar o registro de temperatura, durante 60 segundos. Quando atingiu a marca do tempo estipulado para estabilização, o campo magnético foi ligado e analisou-se o aumento de temperatura de acordo com o tempo. Na marca de 500

segundos, o campo externo foi desligado e a amostra ficou em repouso até 600 segundos. As medidas foram realizadas no equipamento magne Therm 1,5AC (nanoTherics, UK). A temperatura foi monitorada utilizando a sonda de fibra óptica com sensor de GaAs (OTG-M360) acoplada ao transdutor de sinal PicoM, o qual faz a comunicação com o software, todos da empresa Opsens (Canadá). O sensor foi imerso em 2 mL da suspensão de nanopartículas, posicionado sempre no centro da amostra e a uma altura fixa para todas as medidas coincidindo com o centro da bobina, as quais foram obtidas com concentração de 5 mg.mL⁻¹ das amostras de nanopartículas, nanopartículas recobertas e nanopartículas funcionalizadas.

Medidas de mobilidade eletroforética (Potencial Zeta): A medida da estabilidade coloidal do sistema, tal como a magnitude da repulsão ou atração eletrostática das cargas entre partículas, é dada pelo potencial zeta, que é calculado em função da mobilidade eletroforética. O equipamento utilizado para as medidas é o instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As amostras foram preparadas na concentração 0,1 mg.mL⁻¹ em solução de NaCl 1x10⁻³ mol.L⁻¹, o pH foi variado na faixa de 2 a 12, controlado pela adição de soluções de HCl e NaOH, ambos nas concentrações 0,1 mg.mL⁻¹ e 0,01 mol.L⁻¹, sonicadas e deixadas em repouso de um dia para o outro, sendo o tempo necessário para estabilização da carga para posterior análise. As soluções foram redispersas em banho de ultrassom e dispostas em cubeta de poliestireno a 25°C, as leituras foram replicadas três vezes por análise, para consistência dos resultados.

Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS): para a determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas nuas e na presença dos grupos de proteção e funcionalização foi realizada a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). O equipamento utilizado para as medidas é o instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As amostras foram preparadas na concentração 0,1 mg.mL⁻¹ em solução de NaCl 1x10⁻³ mol.L⁻¹. Para as análises que foram realizadas em diferentes pH (na faixa de 2 a 12), ajustou-se com soluções de HCl e NaOH, ambos nas concentrações 0,1 mg.mL⁻¹ e 0,01 mol.L⁻¹, sonicadas e deixadas em repouso de um dia para o outro, sendo o tempo necessário para estabilização da carga para posterior análise. As soluções foram redispersas em banho de ultrassom e dispostas em cubeta de poliestireno a 25°C, as leituras foram replicadas três vezes por análise, para consistência dos resultados. A viscosidade ajustada foi a da água e o ângulo de espalhamento foi de 173°.

Espectroscopia UV-Vis: As medidas de espectroscopia na região do UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35, operando na faixa de comprimento de onda entre 200 e 1000 nm, com velocidade de varredura de 400 nm.min⁻¹ e $\lambda_{\text{max}} = 267$ nm. Todas as amostras foram preparadas utilizando o DMSO como solvente, utilizando o mesmo para o branco. As análises foram realizadas utilizando cubetas de quartzo.

Espectroscopia Raman: A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada para identificar grupos funcionais presentes na superfície das nanopartículas após a funcionalização com ácido fólico. O equipamento utilizado foi Horiba LabRAM HR Evolution, operando com laser de comprimento de onda 785 nm, nas potências 10 e 100%, equipado com uma lente objetiva de 100x no intervalo de 50 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹. O tempo de exposição foi três segundos e oito foi o número de acumulações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

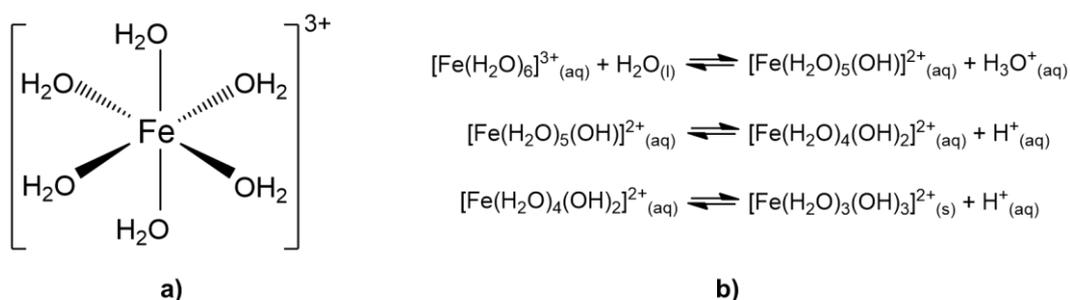
4.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de magnetita em meio aquoso

A metodologia utilizada para a síntese das nanopartículas superparamagnéticas de magnetita em meio aquoso foi a redução-precipitação, que pode ser dividida em dois estágios importantes. A primeira etapa é equivalente a uma rápida nucleação, onde a concentração dos reagentes é determinante para que atinja o estado crítico de supersaturação. A segunda etapa é o crescimento lento do núcleo por difusão de espécies na superfície do cristal, no processo para minimizar a energia de superfície do sistema⁸⁶. Essa síntese vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa, com base no trabalho de Qu *et al.*(1999)³⁵, e em linhas gerais, consiste na preparação e mistura de soluções aquosas dos precursores em proporções estequiométricas. O cloreto férrico (FeCl₃) acidificado é o material de partida, que foi parcialmente reduzido a sal ferroso pela adição de sulfito de sódio (Na₂SO₃), respeitando-se a proporção molar de $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}] = 3$, antes da alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH), na qual os íons hidroxila estão em excesso durante o tempo de reação, conforme a Equação 9. Teoricamente, seria necessário 1 mol de SO₃²⁻ para reduzir 2 mol de Fe³⁺ para Fe²⁺, resultando na proporção molar de $[\text{Fe}^{3+}]_0/[\text{SO}_3]_0 = 6$ e, conseqüentemente, a conversão da razão estequiométrica teórica de $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}] = 2$. Entretanto, notou-se experimentalmente, que o processo de redução é regido por reações de equilíbrio, no qual parâmetros, como a concentração

de HCl, FeCl₃ e Na₂SO₃, podem afetar o equilíbrio no sistema, não correspondendo à proporção inicial esperada. Por isso a proporção $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}]=3$, metade do valor previsto, é a relação inicial ideal.

A concentração do ácido clorídrico (HCl) no preparo da solução do precursor Fe³⁺ é importante para evitar reações indesejáveis de hidrólise do íon complexo férrico hexaaquo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ⁸⁷. Ao dissolver o sal férrico (FeCl₃·6H₂O) em água, forma-se o complexo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, comportando-se como ácido de Brønsted (doadores de prótons). Os oxigênios da molécula de água se coordenam ao íon metálico, deixando os núcleos do hidrogênio com carga parcial positiva, o suficiente para serem retirados em uma reação de hidrólise em meio aquoso. Por essas circunstâncias, é necessário o uso de ácido para o preparo das soluções estoques aquosas de cloreto de ferro(III), na qual irá manter o equilíbrio deslocado para formação do complexo e evitará processos de hidrólises indesejáveis, representadas na Figura 28.

Figura 28 – a) Estrutura do íon complexo férrico hexaaquo, b) Equilíbrios da hidrólise do íon complexo férrico.

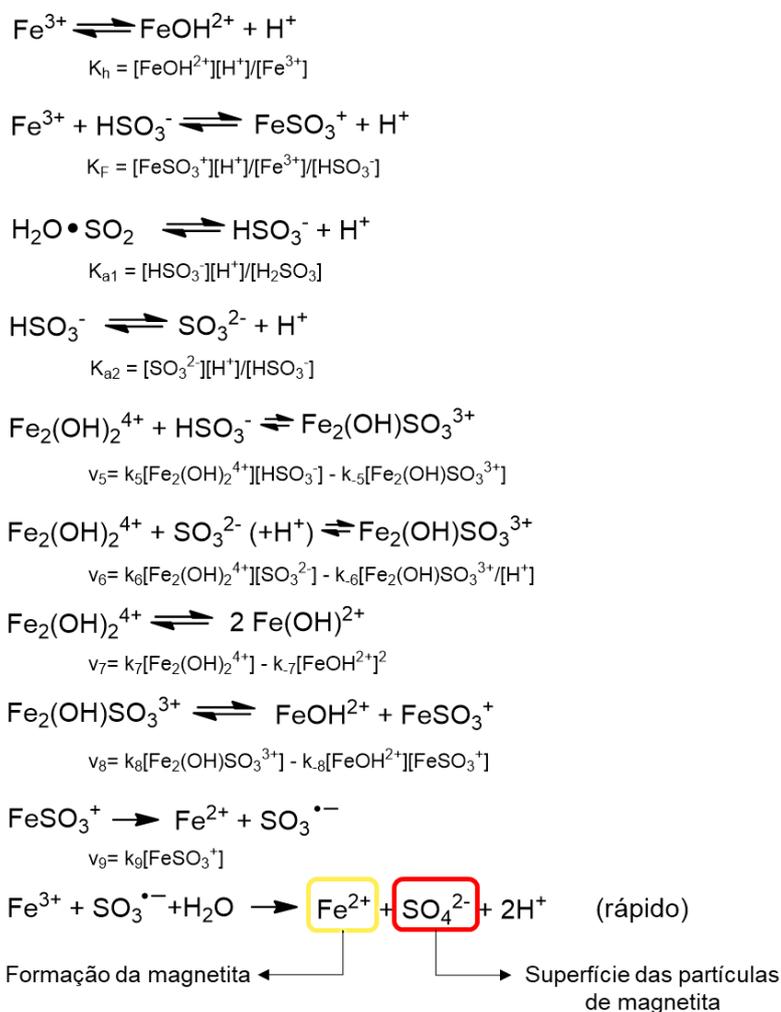


Fonte: Autoria própria

Quando se adiciona a solução de cloreto férrico acidificada e de cor laranja, na solução de sulfito de sódio incolor, imediatamente há uma mudança de coloração para vermelho intenso. Essa mudança de cor indica a formação de um complexo intermediário instável de Fe(III)-S(IV). À medida que o complexo vai reagindo, a solução perde gradativamente a cor vermelha e vai passando para uma coloração amarelo-clara, indicando a redução dos íons de Fe³⁺ para Fe²⁺ (potencial de redução +0,77 V) pelo par de íons S⁶⁺/S⁴⁺ (potencial de redução -0,96 V). O mecanismo cinético dessa reação de redução dos íons Fe³⁺ utilizando sulfito como agente redutor já foi estudado e é relatado na literatura⁸⁷⁻⁹⁰. Como podemos observar na Figura 29, onde na última etapa (etapa rápida), encontra-se o íon ferroso, precursor da síntese da

magnetita, e o sulfato que está presente na superfície das partículas, como será discutido posteriormente.

Figura 29 – Mecanismo cinético da redução de íons férricos em ferrosos utilizando sulfito como agente redutor.



Fonte: Adaptado de Lente (2002, p.781)⁸⁷

Não há na literatura uma fórmula química para o íon complexo intermediário de sulfito de ferro, tornando incerta a sua real composição^{35,87}. Qu *et al.* (1999)³⁵ realizaram um estudo onde, propondo que o complexo entre Fe^{3+} e SO_3^{2-} pode ser expressado como $[\text{Fe}(\text{SO}_3)_n]^{3-2n}$, e pela estequiometria da reação, 1 mol de SO_3^{2-} pode reduzir 2 mols de Fe^{3+} à um pH mais baixo, então, sugeriu que a fórmula do complexo vermelho é $[\text{Fe}_2(\text{SO}_3)]^{4+}$. Já Gábor Lente e István Fábíán (2002)⁸⁷ realizaram um estudo onde as possíveis fórmulas gerais para o complexo intermediário seriam também $[\text{Fe}(\text{SO}_3)_n]^{3-2n}$ ou $\text{cis-Fe}(\text{SO}_3)\text{OH}$, onde nesse mesmo trabalho os autores averiguaram na prática através da cinética de oxidação do íon S(IV) pelo excesso de

íon Fe(III), e propuseram como fórmula a formação de dois possíveis complexos transientes de sulfito, FeSO_3^+ e $\text{Fe}_2(\text{OH})\text{SO}_3^{3+}$.

Apesar da mudança de cor ser instantânea ao misturar os dois precursores, é notório a rápida descoloração e por isso é necessário que o complexo seja adicionado rapidamente na solução de hidróxido de sódio. Isso deve-se ao fato que a transformação dos íons ferrosos é um processo rápido, e ao adicionar essa mistura na solução alcalina no momento da mudança de cor, pode evitar um possível processo de reoxidação dos íons ferrosos, já que a oxidação pelo oxigênio atmosférico dissolvido na base é relativamente lenta³⁵.

Há características visuais que podem ser utilizadas como uma prévia caracterização da formação das nanopartículas de magnetita, uma delas é a cor. Sabe-se que a magnetita (Fe_3O_4) é um pó preto e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é marrom escuro com um tom avermelhado^{46,91}. As amostras sintetizadas nessa etapa apresentaram coloração preta, sendo um indicativo que o material sintetizado de fato é magnetita. Outra característica visível é que as nanopartículas são fortemente atraídas pelo imã, ou seja, apresentam rápida magnetização na presença de um campo magnético. O fato de as partículas de magnetita serem ferrimagnética e estarem em nanoescala implica que ao colocar o imã, o solvente, que no caso é a água, seja arrastado junto com as nanopartículas, atribuído à compostos ferrofluidos^{72,92}, ilustrado na Figura 30.

Figura 30- Amostra de SPIONs com comportamento ferrofluido na presença de um imã.



Fonte: Autoria própria

Há parâmetros de grande importância a serem controlados como o tamanho das partículas, sua forma e a presença de espécies iônicas com suas proporções,

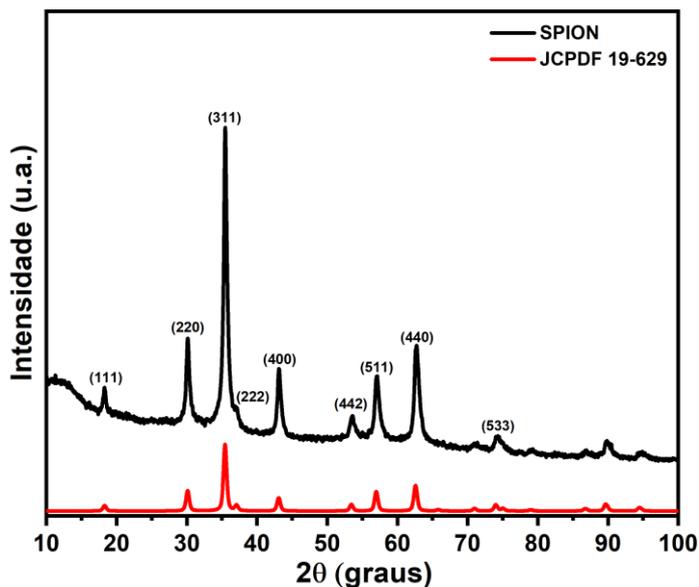
uma vez que estão intrínsecas as propriedades magnéticas do material⁹³. Para esse controle, é necessário ajustar parâmetros que afetam diretamente nos processos de nucleação e crescimento como: temperatura, pH, tempo de reação e natureza dos sais⁸⁶. Após a adição do complexo formado a partir dos íons Fe^{3+} e SO_3^{2-} na solução em excesso de hidróxido de sódio, como discutido anteriormente, a reação permaneceu sob refluxo por 18 horas a 90°C , tempo e temperatura que foram estudados e otimizados anteriormente pelo grupo de pesquisa a fim de obter melhores resultados de hipertermia. O tempo de envelhecimento nessa temperatura controla os processos de crescimento de Ostwald^{86,93,94}, que é um fenômeno termodinâmico espontâneo, onde espécies na superfície são menos estáveis do que as presente no núcleo, ou seja, partículas grandes com menor razão superfície/volume, estão em um estado de energia menor (e com menor energia de superfície). Como o sistema busca reduzir a energia total, as espécies na superfície de partículas menores tendem a difundirem pela solução e unirem-se à superfície da maior partícula. Dessa forma, a quantidade de partículas maiores tendem aumentar, enquanto a de partículas menores diminui^{9,95}.

O tamanho das nanopartículas de magnetita também está interligado com o grau de acidez ou alcalinidade do meio de precipitação. Quanto mais alcalino o meio, menor será o tamanho das partículas e menor a distribuição de tamanho (estado de agregação), pois é um fator determinante para o controle da estrutura química da superfície do cristal, ou seja, a carga eletrostática da superfície da nanopartícula. Outro parâmetro que interfere diretamente no tamanho das partículas é a temperatura, quanto maior a temperatura, maior será a polidispersividade das nanopartículas, visto que o aumento da temperatura minimiza o grau de aglomeração dos núcleos da magnetita e conseqüentemente reduz o seu tamanho. Uma justificativa para isso, é que com o aumento da temperatura, estamos adicionando mais energia ao sistema, acarretando no aumento do movimento das partículas, intensificando o número de colisões entre elas e intensificando os processos difusionais⁸⁶.

4.2. Caracterização e análise estrutural, composicional e morfológica das nanopartículas sintetizadas em meio aquoso

Para análise cristalográfica e identificação das fases presentes na amostra dos SPIONs sintetizados, a fim de confirmar a formação de magnetita, foi realizada a análise de DRX e comparada com o padrão JCPDF 19-629 (Figura 31).

Figura 31 – Difratometria de Raio X da amostra de SPIONs sintetizada via redução-precipitação e padrão JCPDF 19-629.



Fonte: Autoria própria

Conforme se observa na Figura 31, a amostra sintetizada via redução-precipitação em meio aquoso corresponde ao padrão de magnetita presente na literatura (JCPDF 19-629), indicando que óxido de ferro formado apresenta uma estrutura de espinélio cúbico cristalino característico da magnetita. Os picos de difração em 18.2°, 30.1°, 35.4°, 37.1°, 43.2°, 53.6°, 57°, 62.8° e 74.2° correspondem aos planos cristalográficos (111), (220), (331), (222), (400), (442), (511), (440) e (533), respectivamente, da estrutura espinélio invertido de Fe_3O_4 .

Pela análise de DRX também foi possível calcular os tamanhos médios de cristalito (D_{DRX}) nas amostras utilizando a Equação de Scherrer (Equação 10), que relaciona o comprimento de onda da radiação eletromagnética (λ), com a largura total na metade da altura do pico máximo, também chamada de FWHM (β), e o ângulo de difração(θ)⁹⁴, sendo K a constante de Scherrer, relacionada à forma da partícula.

$$D_{hkl} = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 10}$$

A constante de Scherrer (K) possui o valor igual a 0,94, o comprimento de onda da radiação utilizada (λ) equivale a 0,154056 nm, e θ é o ângulo de Bragg em radiano. Para o cálculo do tamanho médio de cristalito dos SPIONs foram escolhidos os três picos de maior intensidade. Utilizou-se o programa OriginLab para determinar os

valores dos parâmetros β e θ , que se encontram na Tabela 2, e por fim, substituindo-os na Equação 10, obteve-se um valor médio de cristalito de $14,6 \pm 3$ nm.

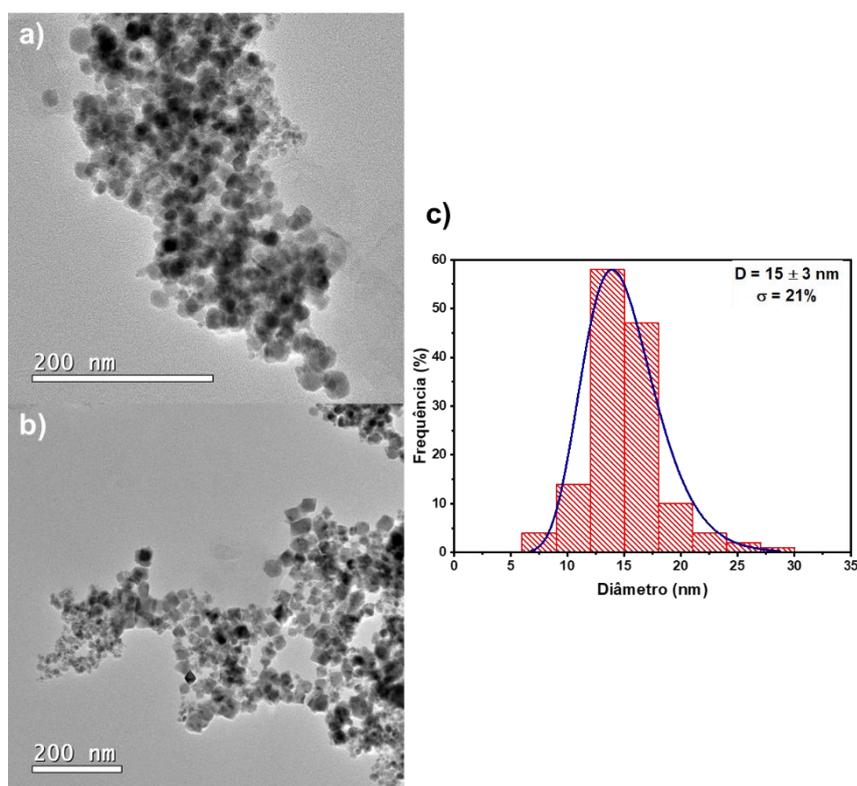
Tabela 2– Valores utilizados para o cálculo do D_{DRX} e seus respectivos valores.

Ordem de intensidade	β (rad)	2θ (graus)	θ (rad)	D_{DRX} (nm)
1°	0,010532	35,5°	0,309795	13,75
2°	0,011902	62,8°	0,548033	12,17
3°	0,008061	30,1°	0,262672	17,97

Fonte: Autoria própria

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizada para avaliar o tamanho, a forma e a polidispersividade das nanopartículas, sendo possível corroborar os dados calculados a partir das informações obtidas pela técnica de DRX. Na Figura 32a e b, observa-se que as partículas, em geral, apresentaram em sua maioria o formato esferoidal, com a presença de cubos, e com pequeno grau de polidispersividade. Na imagem se observa aglomerados de SPIONs, porém era o esperado para amostras sintetizadas em água, já que as nanopartículas magnéticas tendem a se aglomerar com a secagem do solvente.

Figura 32- Imagens TEM dos SPIONs sintetizados via redução-precipitação em meio aquoso e respectivo histograma da distribuição de tamanhos.



Fonte: Autoria própria

O tamanho médio das nanopartículas (D_{TEM}) foi calculado a partir das imagens apresentadas na Figura 32a e b, utilizando o programa ImageJ.

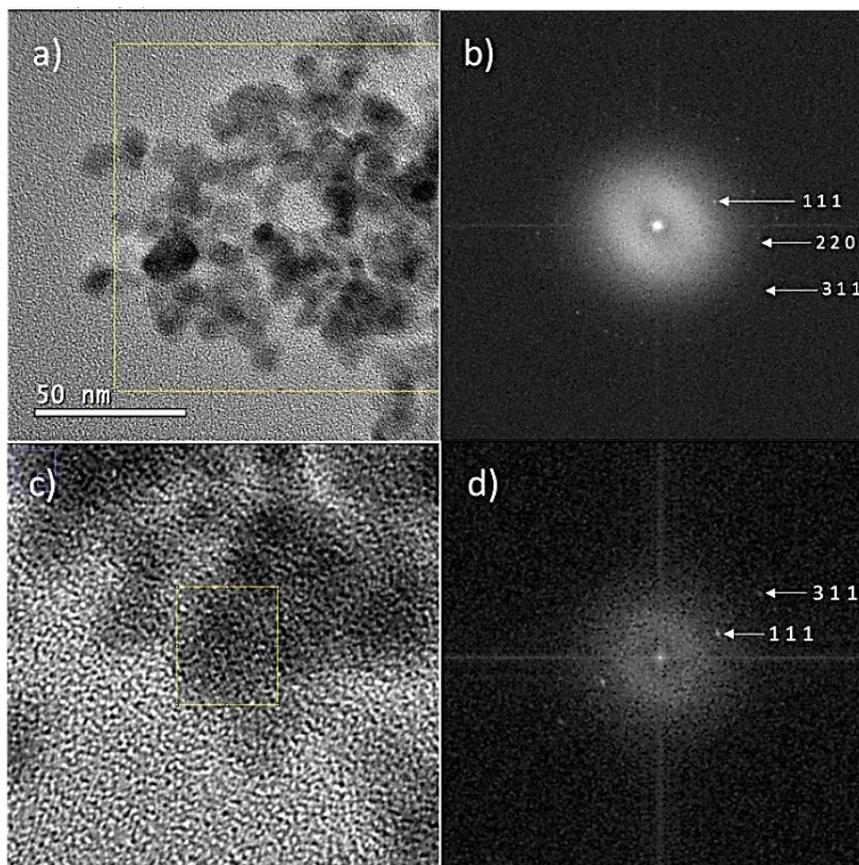
A partir dos valores medidos, foi construído o histograma e a curva de distribuição de tamanhos, apresentada na Figura 32c. Para o cálculo do número de barras necessário para construir o histograma (bin size), utilizou-se a Equação 11. O valor de tamanho médio das nanopartículas magnéticas obtido foi de aproximadamente 15 ± 3 nm e o valor da polidispersividade, calculado pela Equação 12, foi 21%. Os valores de tamanho médio calculados pela medida de transmissão (D_{TEM}), corroboram os cálculos realizados anteriormente utilizando a DRX (D_{DRX}), onde o valor foi de $14,6 \pm 3$ nm. Essa informação é de grande importância, visto que na literatura encontra-se que as nanopartículas se tornam superparamagnéticas à temperatura ambiente quando o seu tamanho é próximo a 15 nm^{70,96,97} e adiciona a informação de se tratar de um sistema cristalino.

$$bin\ size\ (k) = 3,22 \cdot \log(\text{número de partículas}) + 1 \quad \text{Equação 11}$$

$$Polidispersividade\ (\sigma) = \frac{Desvio\ Padrão}{Tamanho\ médio} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

A Figura 33 apresenta também imagens realizadas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta-resolução (HRTEM), permitindo visualizar planos cristalinos e a realização de transformada de Fourier (FFT) para observar padrões de difração. Na Figura 33a encontra-se a imagem original das nanopartículas magnéticas sintetizadas, onde foi delimitada uma área e realizada a transformada de Fourier, apresentada na Figura 33b, sendo possível observar a difração de um material policristalino, devido à presença de várias nanopartículas na região selecionada. Na imagem do padrão de difração eletrônico obtido pela FFT da área contendo vários SPIONs é possível notar *spots* distribuídos em halos, e a distância entre eles, calculada pelo programa ImageJ, permite determinar os planos cristalográficos, como indexado na Tabela 3.

Figura 33- Imagem TEM, a) SPIONs, b) FFT da indicada em (a), c) HRTEM mostrando planos cristalográficos e d) FFT da região destacada em (c).



Fonte: Autoria própria

Tabela 3 – Dados para os cálculos dos planos cristalográficos[JCPDF 19-629].

2θ (graus)	Distância (nm)	hkl
18,36	4,8313	111
30,21	2,9585	220
35,58	2,5230	311
37,22	2,4156	222
43,25	2,0920	400
53,66	1,7081	422
57,20	1,6104	511
62,82	1,4793	440
74,33	1,2761	533

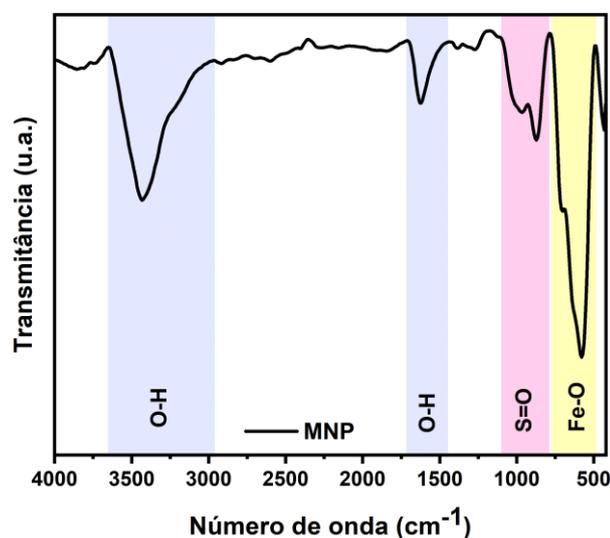
Fonte: Autoria própria

A Figura 33c mostra uma região em maior aumento, onde é possível observar orientação de planos cristalográficos de uma nanopartícula individualizada. Aplicou-se a transformada de Fourier nessa região, obtendo-se o padrão mostrado na Figura 33d como imagem resultante com seus respectivos planos cristalinos, e utilizando o programa ImageJ, calculou-se o valor das distâncias interplanares de 0,49 nm e 0,25

nm, correspondendo aos planos (111) e (311) da magnetita, respectivamente. Assim, os dados de TEM analisados anteriormente a partir da Figura 33 consolidam as informações obtidas na análise de DRX, inferindo a formação de nanopartículas cristalinas de magnetita na estrutura de espinélio invertida.

As amostras de nanopartículas magnéticas foram caracterizadas por meio de FTIR para identificar a presença de impureza nas amostras, avaliando a eficiência do processo de lavagem por separação magnética, como também verificar a banda de Fe-O referente a formação do óxido de ferro. O resultado é mostrado na Figura 34 e as atribuições das ligações estão representadas na Tabela 4.

Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de SPIONs.



Fonte: Autoria própria

Tabela 4 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho dos SPIONs.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração
708-578/432	ν_1/ν_2 Fe-O
3431	ν O-H,sim e ν O-H,assim
1627	δ O-H
977-873	ν S=O

Fonte: Autoria própria

Em um estudo por espectroscopia infravermelho em ferritas feito por Waldron (1955)⁹⁸, atribuiu-se duas bandas de absorção correspondentes a ligação Fe-O em partículas de Fe₃O₄, uma em torno de 570 cm⁻¹, referente a vibração de estiramento ν_1 , e outra em 370-380 cm⁻¹, referente a vibração de estiramento ν_2 . Contudo, esses valores correspondem à ligação Fe-O na magnetita em sua forma *bulk*, quando as

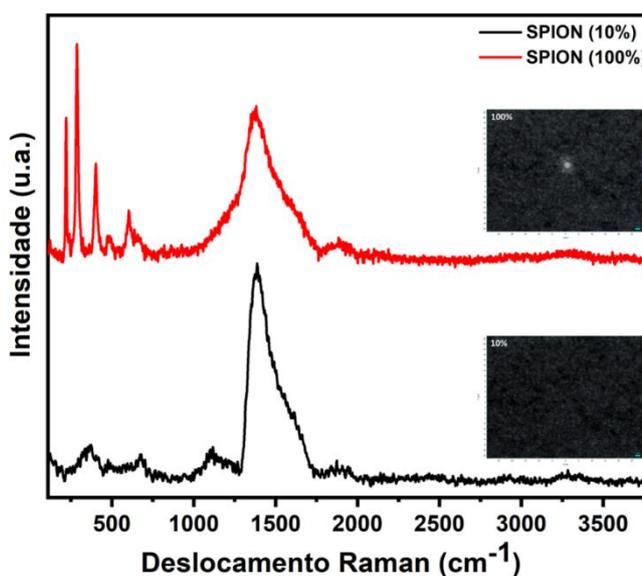
dimensões são reduzidas à escala nanométrica, essas bandas de absorção são deslocadas para maiores números de ondas, próximo de 600 e 440 cm^{-1} , devido ao aumento da constante de força de ligação⁹⁷⁻⁹⁹. No espectro FTIR na Figura 34, verificou-se que a banda de Fe-O referente a vibração do estiramento ν_1 desdobrou em duas bandas em torno de 578 e 708 cm^{-1} e a banda referente a vibração de estiramento ν_2 está presente em torno de 432 cm^{-1} . Esse desdobramento na banda referente ao estiramento ν_1 ocorre ainda pelo fato de as partículas estarem na escala nanométrica, visto que ao diminuir o tamanho, diminui-se também o número de ligações para átomos na superfície, portanto, ocorre um rearranjo dos elétrons não localizados na superfície das nanopartículas^{97,99}. A banda alargada em torno de 3431 cm^{-1} é referente aos modos vibracionais de estiramento simétrico e assimétrico da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H,sim}}$ e $\nu_{\text{O-H,assim}}$). Em 1627 cm^{-1} temos a banda referente a deformação da ligação H-O ($\delta_{\text{O-H}}$). Estas bandas podem ser atribuídas às moléculas de água adsorvidas nas nanopartículas visto que a síntese e o armazenamento ocorreram em meio aquoso.

O desdobramento em 977 e 873 cm^{-1} são bandas atribuídas aos modos de estiramento da ligação S=O para grupos sulfatos, sulfóxidos e sulfonatos¹⁰⁰. Estas bandas indicam a presença de impureza, proveniente da adsorção de íons contendo enxofre na superfície do material. As lavagens realizadas com solução levemente alcalina, diminuíram a intensidades das bandas referentes a ligação S=O, mas não houve remoção completa, indicando que os íons sulfato se adsorvem fortemente à superfície das nanopartículas. A presença de íons nas superfícies das partículas coloidais influencia diretamente na carga de superfície resultante, dimensões da dupla camada elétrica, comportamento de adsorção de íons ou outras interações de superfície, como também nos mostram a estabilidade coloidal pelas medidas do potencial zeta⁹⁵.

A magnetita é considerada um fraco dispersor Raman, principalmente em baixas potências/intensidades do laser, o que é fundamental para evitar transformações de fase do óxido de ferro por irradiação do laser. Li *et al.* (2012)¹⁰¹ realizou um estudo com espectros Raman de nanopartículas magnéticas (MNP) de magnetita em diferentes potências do laser, em ordem crescente de intensidade. Para obter o espectro da magnetita, foi incidido inicialmente um laser de baixa potência. A primeira conversão de magnetita (Fe_3O_4) em maghemita metaestável ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), como

uma fase intermediária, ocorreu com um pequeno aumento na potência. Por fim, a segunda transformação decorreu de um novo aumento da potência do laser, e o espectro obtido foi equivalente à fase hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Essas mudanças estruturais de fase de magnetita em hematita, passando por uma fase transiente de maghemita, é justificado ao efeito de aquecimento ocasionado pelo aumento da potência/intensidade do laser. Os espectros Raman e as imagens após realizar as análises estão presentes na Figura 35, e as suas respectivas atribuições na Tabela 5.

Figura 35 – Espectro Raman da amostra de SPIONs nas intensidades de laser 10% e 100%.



Fonte: Autoria própria

Tabela 5 – Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Óxido de Ferro		
	10%	100%	
369	Maghemita	221	Hematita
478	Maghemita	241	Hematita
677	Magnetita	286	Hematita
1118	-	402	Hematita
1387	Hematita	488	Hematita
		604	Hematita
		1382	Hematita

Fonte: Autoria própria

A espectroscopia Raman é capaz de identificar os efeitos de ordem-desordem de cátions presentes nos sítios octaédricos e tetraédricos de magnetitas ($\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$) não-estequiométrica, ou seja, que apresentam pequena fração de maghemita em sua estrutura, sendo um exemplo clássico de ferrita espinélio cúbica

invertida (AB_2O_4). Por ser uma espectroscopia vibracional, pode avaliar a dinâmica de rede desses compostos¹⁰². A magnetita é considerada um baixo dispersor no Raman, devido a presença de um centro de inversão no grupo espacial centrossimétrico ($Fd3m$), ocasionando a exclusão mútua das atividades espectroscópicas para os mesmos modos vibracionais. Na Figura 35, no espectro Raman para laser com intensidade de 10% (linha preta), nota-se a presença de uma banda característica da magnetita na região de 677 cm^{-1} , atribuída a uma extensão simétrica de átomos de oxigênio ao longo das ligações Fe-O (A_{1g})^{101,102}. As bandas em 369 e 478 cm^{-1} são referentes a estrutura maghemita¹⁰¹, que podem estar presentes por dois motivos: fazer parte de sítios na estrutura não-estequiométrica da partícula de magnetita ou ser uma fase intermediária de transição após a incidência do laser. Uma banda de alta intensidade alargada na região de 1387 cm^{-1} é atribuída a banda de segunda ordem da hematita, que é proveniente da conversão estrutural após aplicar o laser^{101,102}, uma vez que essa fase do óxido de ferro não se encontra nas medidas de DRX.

Para as amostras de SPIONs recobertas e funcionalizada, que será discutida posteriormente, notou-se a necessidade de a incidência do laser com maior intensidade para obter as informações necessárias. Com isso, realizou-se a análise para a mesma amostra de SPIONs com o laser na intensidade de 100% (linha vermelha), na qual é possível identificar a conversão da fase magnetita em hematita. Por conta da presença dos íons de ferro bivalente na estrutura da magnetita, permite ela ser facilmente suscetível à oxidação com o acréscimo de temperatura, ocasionado pelo aumento da intensidade do laser. Os espalhamentos Raman das hematitas são maiores que os da magnetita, resultando em maior quantidade de bandas de alta intensidade e bem definidas. As respectivas atribuições das vibrações nessa amostra são^{101,102}: 221 cm^{-1} (A_{1g} (1)), 241 cm^{-1} (E_g (1)), 286 cm^{-1} (E_h (2) + E_g (3)), 402 cm^{-1} (E_g (4)), 488 cm^{-1} (A_{1g} (2)), 604 cm^{-1} (E_g (5)), 1382 cm^{-1} (Espalhamento de segunda ordem).

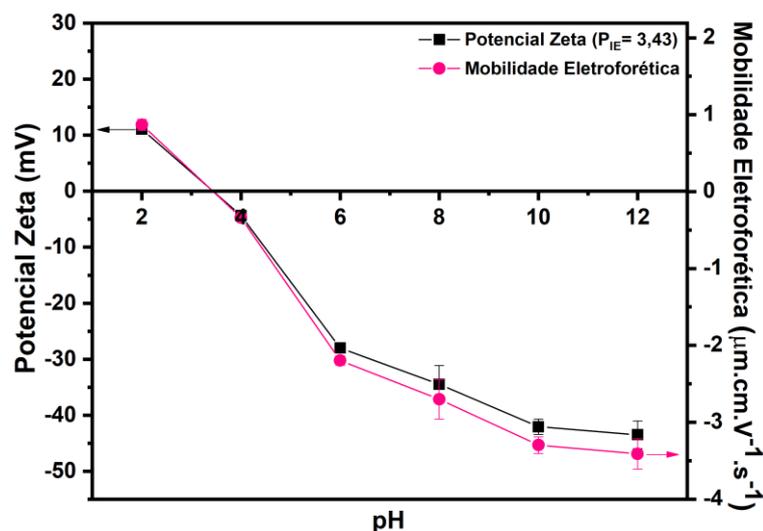
Quando há interação partícula-partícula, devemos considerar duas forças principais: van der Waals e repulsão eletrostática¹⁰³. Baseada nessas interações, o valor de potencial zeta (ζ) é calculado em função da mobilidade eletroforética (μ), sendo a razão entre a velocidade em que as partículas se movem na dispersão e o campo elétrico aplicado encarregado pela movimentação das partículas no meio, por conta da diferença de potencial, relacionado com a carga da partícula. Essa técnica mede o potencial eletrostático no limite da camada compacta e a camada difusa das partículas coloidais, demonstrando também a estabilidade da suspensão^{86,104}. Quanto

maior a magnitude do potencial zeta, maior será a repulsão eletrostática, assim as partículas tendem a ficar dispersas na solução, ou se as partículas sofrem pouca repulsão eletrostática, elas tendem a flocular ou aglomerar¹⁰³.

É importante ressaltar a diferença entre ponto isoelétrico (P_{IE}) e ponto de carga zero (P_{Cz}). O primeiro equivale ao potencial electrocinético no plano de cisalhamento, obtido a partir da medida de potencial zeta, igualando-se a zero. Já o segundo corresponde ao pH na qual a densidade de carga da superfície é igual a zero, e é obtido por titulação potenciométrica^{103,105}. Óxidos de ferro com superfície anfótera muda o seu estado de carga de acordo com o pH e a concentração de eletrólito. Quando analisado a sua mobilidade eletroforética, ocorre uma inversão em um pH característico, indicando que não houve retenção de carga em excesso, denominado pH do ponto isoelétrico (P_{IE}). Devido à mobilidade dessas partículas, elas colidem constantemente entre si, e ao atingir o ponto isoelétrico, como não há cargas estabilizando-as, há uma tendência em formar grandes floculados¹⁰⁵. Na literatura encontra-se como regra geral que para uma boa estabilidade das partículas, os valores de potencial zeta devem estar acima de 30 mV ou abaixo de -30 mV e para uma excelente estabilidade esses valores são referenciados como ± 60 mV. Se os valores de potencial zeta estiverem em torno de ± 20 mV a estabilidade é de curto prazo, e valores na faixa de -5 mV a +5 mV indicam uma agregação rápida^{86,106,107}.

Diferentes sais podem ser empregados em sínteses de óxidos de ferro. Para a metodologia utilizada nesse trabalho, os íons residuais cloretos (Cl^-) e sulfatos (SO_4^{2-}) podem ficar adsorvidos na superfície das nanopartículas de SPIONs, afetando o valor do potencial zeta do material. Tanto os íons Cl^- , como também os íons SO_4^{2-} , diminuem o valor do P_{IE} , na qual ambos podem ser removidos por lavagens com solução alcalina de NaOH. Após a lavagem, os íons hidroxilas (OH^-) da base devem substituir os cloretos presentes na interface das partículas, entretanto os íons sulfatos ficam fortemente adsorvidos na superfície das nanopartículas, dificultando a sua remoção¹⁰³, como caracterizado na análise de FTIR.

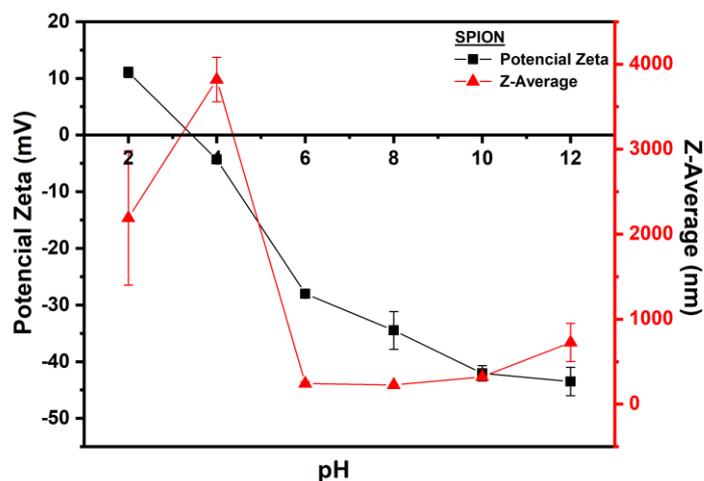
Figura 36 – Potencial Zeta e mobilidade eletroforética das nanopartículas de magnetita dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.



Fonte: Autoria própria

A medida de potencial zeta apresentada na Figura 36, mostra o efeito da mudança de pH na carga de superfície das nanopartículas de magnetita. Determinou-se o valor do ponto isoelétrico $P_{IE}=3,43$, porém é um valor menor do que normalmente observado para partículas nuas (ao redor de $\text{pH} = 6-7$)¹⁰⁸ e é explicado pela adsorção de íons sulfato, os quais diminuem o ponto isoelétrico dos óxidos de ferro (carga de superfície negativa). Um ponto importante observado nas medidas de potencial eletrocinético, é o fato de as nanopartículas estarem fortemente carregadas em $\text{pH} \sim 7$ (potencial zeta ~ -30 mV), conferindo boa estabilidade de suspensões em meio aquoso. Essa maior estabilidade pode ser atribuída a presença de íons sulfato na superfície dos SPIONs. Embora um excesso dessa espécie possa interferir nos processos de recobrimento com diferentes moléculas, em quantidade moderada aumentam a dispersibilidade das partículas sem prejuízo aos processos de recobrimento, como será discutido mais adiante. A relação entre a carga de superfície das partículas e a medida do potencial zeta em função do pH está diretamente relacionada com a dispersão das partículas e consequentemente com os valores do diâmetro hidrodinâmico, na qual é possível correlacionar com a estabilidade ou floculação/agregação.

Figura 37 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico (Z-average) versus pH dos SPIONs.



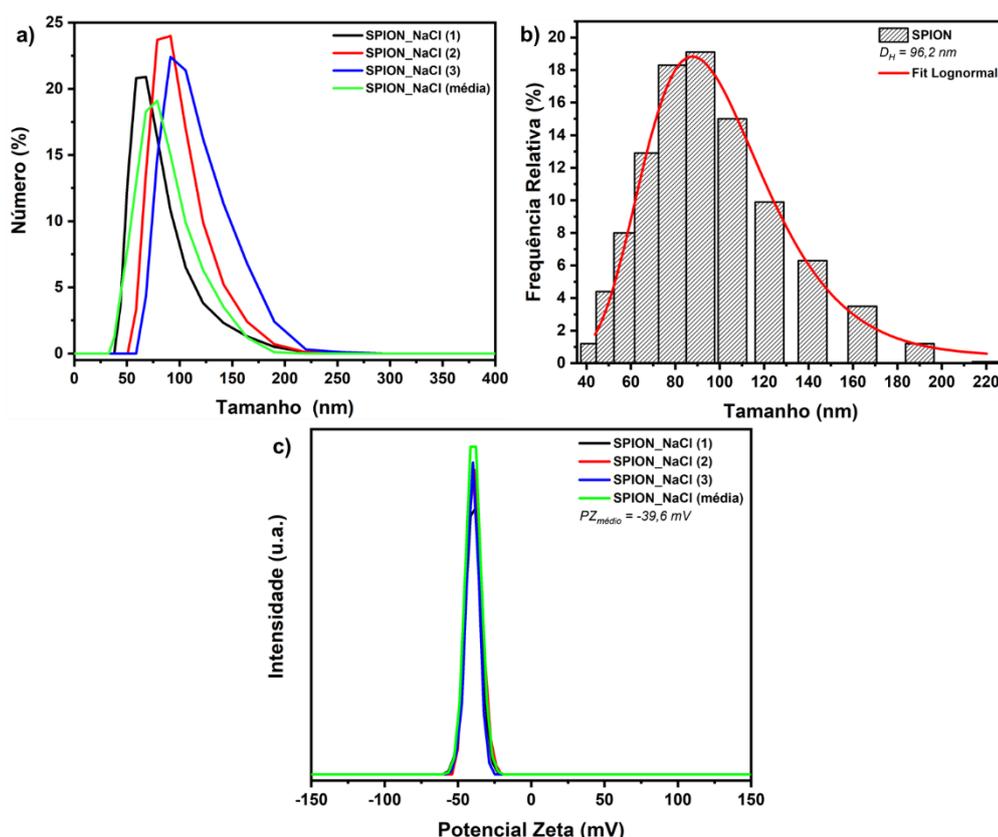
Fonte: Autoria própria

Na Figura 37 podemos observar a relação de correlação dos valores de potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*) em função pH para as amostras de SPIONs. Em pH 2 e 4 os valores de potencial zeta encontra-se abaixo da faixa de estabilidade das partículas (entre ± 20 mV), em razão da protonação dos grupos sulfatos presentes na superfície das partículas, conseqüentemente, nota-se que os valores de *Z-Average* são maiores nessa faixa de pH. Isso ocorre devido à baixa estabilidade nessa região, favorecendo a agregação ou floculação das partículas. Ao aumentar os valores de pH, há também um aumento dos valores do potencial zeta (> -30 mV), melhorando a estabilidade coloidal das partículas e diminuindo o estado de agregação, com isso, pode-se observar que houve uma diminuição no tamanho hidrodinâmico dos SPIONs. É possível também avaliar a estabilidade pelos valores de índices de erro, onde para as partículas menos estáveis, os valores dos erros são maiores, indicando o aumento de tamanho ocasionado pelo processo de agregação, enquanto para nanopartículas mais estáveis, esses índices são imperceptíveis, exceto para o pH 12 que também possui um erro maior, demonstrando uma pequena instabilidade no sistema para esse pH.

Outra forma de avaliar a estabilidade de um sistema coloidal é analisar as curvas de distribuição de tamanho pelo número (porcentagem de partículas). A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), que também é conhecida como espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz quase elástica,

correlaciona o movimento browniano das partículas em uma suspensão coloidal com o tamanho hidrodinâmico do material. Portanto, para obter o tamanho é necessário analisar o movimento dessas partículas em um intervalo de tempo (função de correlação). Partículas com tamanhos menores se difundem rapidamente, ou seja, um rápido movimento browniano em solução, e sua função de correlação é reduzida ligeiramente. Nesse caso, ao incidir a luz do laser, a amostra sofrerá um fenômeno conhecido como alongamento de Doppler. Pelo fato dela movimentar-se rapidamente, a luz irá espalhar em diferentes posições e direções, alargando a distribuição de tamanho. Entretanto, quando os volumes hidrodinâmicos são maiores, os movimentos são mais lentos, acarretando uma diminuição do movimento browniano, e a correlação será prolongada, resultando em posições semelhantes em tempos diferentes, e com isso a distribuição de tamanho será mais estreita¹⁰⁹.

Figura 38- a) Curvas de distribuição de tamanho em função do número de partículas para os SPIONs, b) Histograma de distribuição de tamanho, c) Curvas do potencial zeta dos SPIONs.



Fonte: Autoria própria

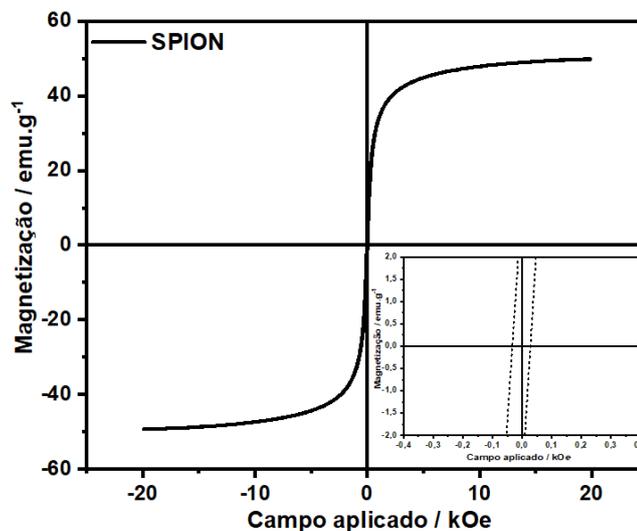
Para avaliar a confiabilidade do tamanho hidrodinâmico das partículas e a sua estabilidade coloidal, foram realizadas três corridas consecutivas, na qual as curvas deveriam se sobrepôr. Porém, observa-se na Figura 38a que houve um pequeno

deslocamento nas curvas no decorrer das corridas. Uma alta concentração de partículas no meio, pode ter influenciado nesse resultado. SPIONs difundem-se rapidamente, por migração, na dispersão devido ao seu pequeno tamanho. Por conta da alta concentração da amostra em solução, dificultou-se a movimentação dessas partículas, e somado a alta energia de superfície (relação superfície/volume), houve uma contribuição para a agregação desse material, justificando o aumento do diâmetro hidrodinâmico com o decorrer do tempo. Entretanto, ao considerar as medidas de potencial zeta presentes na Figura 38c, nota-se que há uma estabilidade coloidal das partículas em relação à carga de superfície, uma vez que as curvas se sobrepõem em uma faixa estável de potencial zeta em $\sim 39,6$ mV. Apesar do pequeno aumento de tamanho, o índice de polidispersividade foi de 0,494, indicando uma boa qualidade dos resultados.

O ajuste na concentração de nanopartículas diminuiria colisões entre elas e, conseqüentemente, melhoraria a estabilidade evitando a formação de agregados, e concedendo uma maior confiabilidade em seu tamanho hidrodinâmico. Contudo, não foi possível realizar o estudo de ajuste para esse parâmetro, em razão da Pandemia. Apesar disso, na Figura 38b foi construído um histograma do tamanho hidrodinâmico médio pelo número de partículas, na qual podemos observar uma larga distribuição, atribuído ao comportamento de um sistema com partículas pequenas e monodispersas. A diferença entre o valor obtido pela contagem de partículas na Microscopia Eletrônica de Transmissão ($D_{TEM} = 15$ nm) e o valor médio do tamanho na análise de DLS ($D_H = 96,2$ nm), é decorrente do raio hidrodinâmico, uma vez que as partículas são pequenas, e a camada de hidratação e a força iônica do meio, irá influenciar na dupla camada elétrica, como também o caráter hidrofílico da superfície da nanopartícula dos SPIONs. Além disso, a presença do solvente pode levar à formação de pequenos aglomerados de nanopartículas, os quais permanecem estáveis devido às forças de interação na dispersão. Os dados de TEM comparados com as medidas de DLS, sugerem que, na média, ocorre a formação de clusters estáveis de nanopartículas com um número médio de 6-7 partículas por cluster.

A curva de magnetização da amostra de magnetita foi obtida através de medidas em um magnetômetro de amostra vibrante. O resultado da análise de VSM está presente na Figura 39.

Figura 39 – Curva de histerese magnética dos SPIONs de magnetita. No detalhe uma ampliação indicando os valores de coercividade.



Fonte: Autoria própria

O perfil do laço de histerese demonstra o comportamento superparamagnético das nanopartículas, com histerese próxima de zero em relação ao campo coercitivo e um alto crescimento da magnetização de acordo com o campo H aplicado. O valor de magnetização de saturação é de 50 emu.g^{-1} , próximo dos valores encontrados na literatura^{94,110}, sendo um valor considerável para sistema em nanoescala, já que para um material *bulk* é ao redor de $85\text{-}90 \text{ emu/g}$ ¹¹¹. Cabe ressaltar que o laço de histerese tem crescimento praticamente vertical em campo próximo a zero, ou seja, um valor baixo de coercividade, e uma transição pouco sutil aonde começa a região de saturação magnética em torno de 47 emu.g^{-1} , região do ciclo de histerese que é bastante influenciada pela distribuição de tamanho das partículas. Esse comportamento pode ser considerado superparamagnético, e indica que o tamanho das partículas pertence à faixa de tamanho crítico, o que é de grande importância para o objetivo desse trabalho.

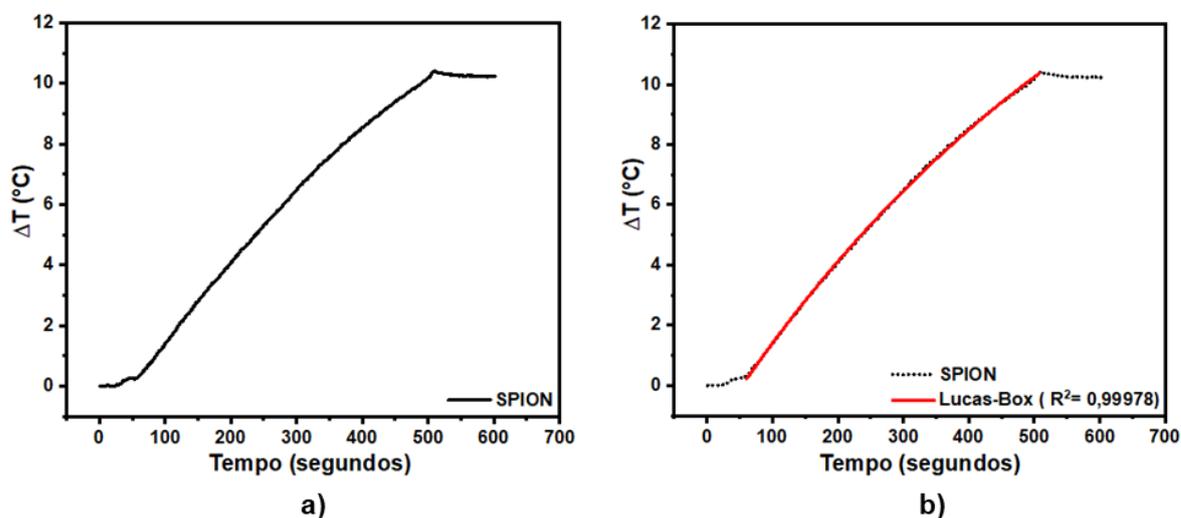
Como mencionado na parte experimental, o campo magnético alternado aplicado na hipertermia é de 24 mT , o equivalente à 240 Oe , o qual corresponde a uma magnetização de $\sim 25 \text{ emu/g}$ na curva da Figura 9. Esse valor pode ser considerado apropriado, sugerindo que cerca de 52% dos SPIONs se encontram saturados nesse campo. Idealmente, ainda é necessário um maior ajuste nas condições experimentais para tentar diminuir o grau de polidispersão.

A polidispersão afeta o perfil da curva de magnetização afastando a região de rápida subida da magnetização em baixos valores de campo. Distribuição mais

estreita de tamanho de partículas levam a uma ascensão praticamente paralela ao valor de campo zero, onde mais de 90% das nanopartículas se encontram saturadas em baixos campos. Geralmente, pequenas variações no grau de polidispersão causam variação intensa no perfil da curva, por isso, os resultados aqui são considerados aptos.

Além do comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, outra característica importante para aplicação em sistemas biológicos é avaliar o potencial de liberação de calor dos SPIONs na presença de um campo magnético alternado.

Figura 40 – a) Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação de campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) b) Ajuste de Lucas-Box.



Fonte: Autoria própria

A variação de temperatura em função do tempo das nanopartículas foi avaliada por medidas de hipertermia, apresentada na Figura 40a. Uma suspensão aquosa na concentração de 5 mg/mL foi utilizada e o ensaio de hipertermia foi realizado com baixos valores de frequência e magnitude de campo (109,8 kHz; 24 mT), sendo possível conciliar as propriedades magnéticas com o mínimo risco de efeito colateral. De fato, esses valores vêm sendo amplamente discutidos na literatura, mas recentemente, uma empresa alemã apresentou o primeiro protótipo de equipamento para aplicação de hipertermia em seres humanos¹¹². Recomendações técnicas e de segurança, limitaram o valor de frequência e campo para valores próximos a 110 kHz e 22 mT, respectivamente. Esses valores impedem uma possível geração de correntes de Foucault durante tratamentos, podendo levar o paciente a uma parada cardiorespiratória¹¹³. A taxa de aquecimento foi de 1,35 °C/min, o que pode ser considerado promissor, uma vez que é necessário um tempo curto de exposição ao

campo magnético externo para que as células tumorais atinjam a temperatura de apoptose (elevar a temperatura corporal de 37°C para que a apoptose ocorra entre 40-45°C)^{76,114}.

A capacidade de um material magnético, no caso os SPIONs, de absorver energia de um campo alternado, é quantificada pelo SAR (taxa de absorção de calor específico) ou também conhecido com SLP (perda equivalente específica de parâmetro). Para obter um valor confiável de SLP, a curva de aquecimento foi ajustada com uma equação Lucas-Box (Figura 40b) pela Equação 6. O SLP foi calculado pela Equação 7, e a normalização de valores de SLP, uma vez que as medidas podem ser realizadas em diferentes frequências e amplitudes, utiliza-se o cálculo do ILP (poder de perda intrínseca, nHm²/Kg) a partir da Equação 8. Os valores calculados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para a amostra de SPIONs.

Concentração (mg _{MNP} /mL)	Concentração (mg _{Fe} /mL)	S _m	SLP (W.g ⁻¹)	H (kA/m)	f (kHz)	ILP (nHm ² .Kg ⁻¹)
5	3,62	0,03124	36,1072	19,1	109,8	0,900

Fonte: Autoria própria

Os valores de ILP presentes na literatura são difíceis de serem comparados, pois não há um método padrão definido para realizar as medidas de hipertermia e geralmente são obtidos em valores de campo e frequência muito superiores ao recomendado atualmente⁷¹. Porém sabe-se que há diferentes fatores que influenciam na taxa de aquecimento como, polidispersividade e tamanho das nanopartículas⁹. Surowiec *et al.* (2017) e os autores Hervault e Thanh (2014) relataram os respectivos ILP, 1,01 e 1,86 nHm².kg⁻¹, sendo valores próximo do que foi obtido nesse trabalho.

4.3. Modificação da superfície dos SPIONs com diferentes alcoxissilanos

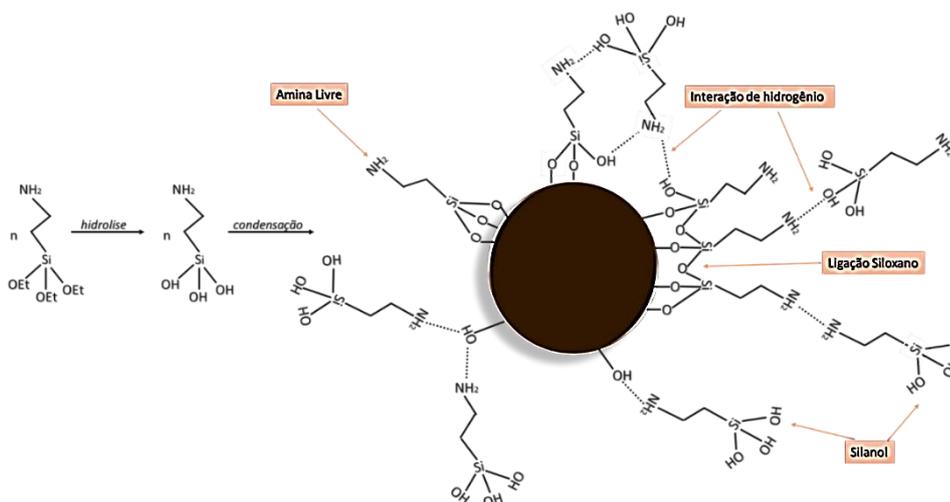
A dispersão dos SPIONs em meio aquoso é de grande importância para aplicações biológicas¹¹⁵. As nanopartículas possuem uma grande relação área de superfície/volume, conseqüentemente uma alta energia de superfície, de modo que elas tendem a se agregar para minimizar essa energia de superfície^{31,86,115-118}. Para a aplicação biomédica é necessário evitar que formem aglomerados, podendo resultar em bioincrustação no plasma sanguíneo, que serão rapidamente eliminados pelo organismo, não sendo possível concluir o objetivo biológico para qual foi aplicado¹¹⁶. Para impedir a auto-agregação, manter as propriedades físico-química e atribuir

funcionalidades à superfície das nanopartículas para uma posterior aplicação biomédica, realizou-se modificações na superfície das nanopartículas com organossilanos^{119–121}. Nesse trabalho utilizou-se o 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS) e o 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (MPTMS).

4.3.1. Modificação com 3-aminopropil-trietóxisilano (SPION@APTS)

O recobrimento de nanopartículas com APTS é bem relatado na literatura, onde podemos encontrar uma grande variedade de metodologias^{5,67,92}. O mecanismo de funcionalização com silanos na superfície das nanopartículas magnéticas formando a ligação Fe-O-Si é semelhante à formação da camada siloxano da sílica⁵⁴. Entretanto, o procedimento é mais complexo⁹⁷, envolvendo possíveis intermediários diferentes e apresentam complicações na formação de monocamadas e policamadas^{54,58}, como apresentado na Figura 41. Muitos fatores podem interferir nos mecanismos de reação de hidrólise e condensação dos alcoxissilanos na superfície das nanopartículas, temperatura, tempo de reação, presença de catalisadores (pH), concentração de silano, reatividade do silano, superfície da partícula e natureza do solvente, são alguns frequentemente relatados^{55,58,97,122}.

Figura 41 – Possíveis ligações/interações do APTS com a superfície dos SPIONs.



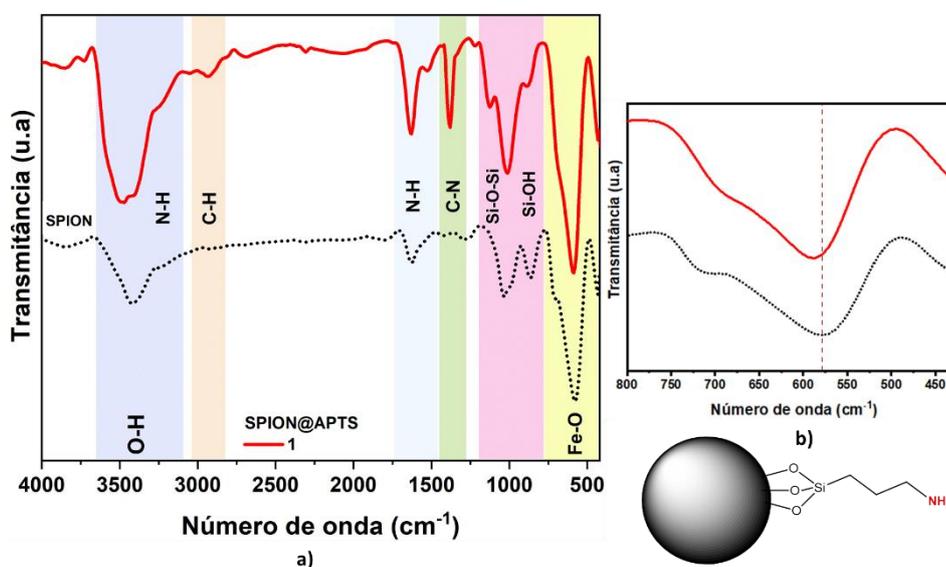
Fonte: Adaptado de Liu *et.al.* (2013)¹²³

No tópico anterior discutiu-se a presença de sulfato na superfície das nanopartículas obtidas pelo método de redução-precipitação. Esse é um fator que interfere diretamente no recobrimento das partículas, já que os silanos possuem pouca eficácia em ligar-se aos grupos sulfatos¹²⁴, sendo necessário realizar adaptações da metodologia escolhida para contornar esse problema.

Inicialmente, se optou por seguir o procedimento descrito no trabalho de Marciello *et al.*⁷⁷(2013) por ser uma síntese verde em meio aquoso, biocompatível e com boas propriedades de hipertermia. No entanto, como mostrado a seguir, os resultados levaram a formação de agregados de nanopartículas e esse procedimento foi posteriormente modificado, como descrito na Parte Experimental. O procedimento inicial pode ser resumido como segue. Em um balão de três bocas foram dispersadas 10 mg de SPIONs em 5 mL de água contendo $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de HNO_3 e a dispersão sonificada por cerca de 5 minutos. Em seguida se adicionou 5 mL de metanol (água/metanol razão 1:1 v/v) e a suspensão foi novamente sonificada por mais 30 minutos. Por fim, adicionou-se gota a gota 529 μL de APTS (SPION/APTS razão 1:50 m/m), deixando a solução com leve agitação mecânica por 15 horas a temperatura ambiente. As nanopartículas recobertas com APTS (SPION@APTS 1) foram lavadas 4 vezes com etanol, centrifugadas (9000 rpm, 10 minutos, 25°C) e por fim, redispersa em água e armazenada para análises.

Para analisar e identificar se há ligações características do recobrimento com o silano na superfície das nanopartículas, realizou-se o estudo por meio da espectroscopia FTIR. A Figura 42 apresenta os espectros das nanopartículas sem recobrimento (SPION) e recobertas com APTS (SPION@APTS 1) e a Tabela 7 as respectivas atribuições dos modos vibracionais.

Figura 42 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 1), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS.



Fonte: Autoria própria

Tabela 7 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 1.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@APTS
708-578/432	ν_1/ν_2 Fe-O	692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O
3431	$\nu_{O-H,sim}$ e $\nu_{O-H,assim}$	3482	$\nu_{O-H,sim}/\nu_{O-H,assim}/$ $\nu_{N-H,assim}$
1627	δ_{O-H}	16534-1527	$\delta_{N-H,assim}$
977-873	$\nu_{S=O}$	1127-1015-878	$\nu_{Si-O-Si}/\nu_{Si-O-H}$
		1235	ν_{Si-C}
		1384	δ_{C-N}
		2934	ν_{C-H}

Fonte: Autoria própria

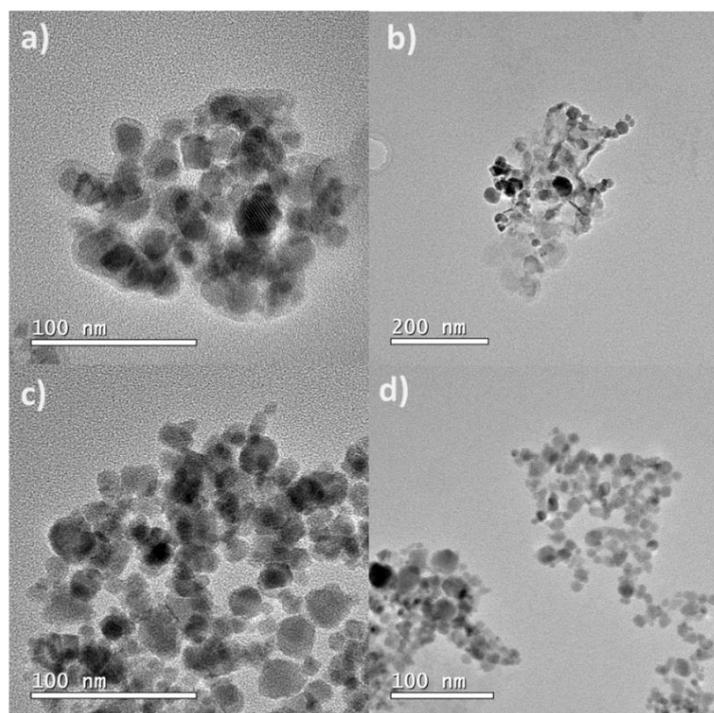
Verificou-se a presença da banda de absorção correspondentes às ligações Fe-O na amostra com recobrimento (SPION@APTS 1), onde nota-se um deslocamento da banda principal para maiores números de onda e o desdobramento para menores números de onda, quando comparada a amostra sem recobrimento (SPION), de 578 e 707 cm⁻¹ para 588 e 692 cm⁻¹, respectivamente. Esse deslocamento da banda principal da ligação Fe-O deve-se a formação de ligações covalentes na superfície da partícula ou deslocamento posicional de componentes da interface¹²⁴, a partir das reações de hidrólise e condensação do alcoxissilano, onde ocorre o aumento da constante de força de ligação química na superfície (Figura 42b). Houve o desaparecimento da banda correspondente a ligação S=O na amostra de MNP na região de 1035 e 865 cm⁻¹ e as bandas de absorção dos grupos silanol e siloxano foram observadas no espectro de absorção da amostra SPION@APTS 1. A confirmação da presença do silano na superfície das nanopartículas de magnetita deu-se pela banda de baixa intensidade na região de 1235 cm⁻¹ atribuída ao estiramento Si-C e as bandas em 1127, 1015 e 878 cm⁻¹ atribuídas aos grupos siloxanos (Si-O-Si) e silanóis (Si-O-H)^{97,99}.

É possível também observar outras bandas que confirmam o recobrimento com o organossilano, indicando a presença do grupo amina. Nota-se no espectro de absorção da amostra SPION@APTS 1 que houve um alargamento e aumento de intensidade, assim como um pequeno deslocamento para maior número de onda da banda 3423 cm⁻¹ para 3482 cm⁻¹, atribuída anteriormente ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo O-H presente na amostra de SPIONs. Esse aumento de intensidade é justificado pela sobreposição do espectro de estiramento de O-H com a deformação axial assimétrica de amina livre ($\nu_{assim N-H}$) presente na estrutura do APTS,

e o deslocamento para maiores comprimentos de onda pode ser explicado pela formação de ligações de hidrogênio. No espectro de absorção para amostra SPION@APTS 1 também é possível identificar a banda com desdobramento de intensidade média-forte na região de 1634-1527 cm^{-1} correspondente a deformação axial assimétrica do grupo amina livre ($\delta_{\text{N-H}}$), e na região de 1384 cm^{-1} se tem a banda de deformação axial da ligação C-N. Ambas sugerem a presença do amino-silano na superfície da partícula. A banda de baixa intensidade na região de 2934 cm^{-1} é atribuída ao modo de estiramento das ligações C-H proveniente também do APTS¹⁰⁰. Apesar da análise por FTIR indicar a presença do APTS na superfície das nanopartículas de magnetita, são necessárias outras técnicas para complementar o estudo e denotar se o recobrimento ocorreu de forma efetiva.

Na Figura 43 são mostradas imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra SPION@APTS 1, e como resultado podemos perceber a presença do APTS na superfície das nanopartículas, porém não como esperado, uma vez que o propósito do recobrimento é que não seja de um grande aglomerado de partículas (Figura 43a). Pode-se observar na Figura 43b a formação de filmes de silano sobre os SPIONs, como também regiões possivelmente não recobertas (Figura 43c). Na imagem apresentada na Figura 43d é possível observar que há regiões do porta-amostra onde as nanopartículas apresentaram uma melhor dispersibilidade, mas a presença da formação de agregados é predominante, indicando que, embora o recobrimento com APTS tenha ocorrido, não foi homogêneo por toda a amostra e levou à intensa formação de agregados, ou seja, um conjunto de nanopartículas embebidas numa matriz de sílica ou interligadas pela camada de superfície.

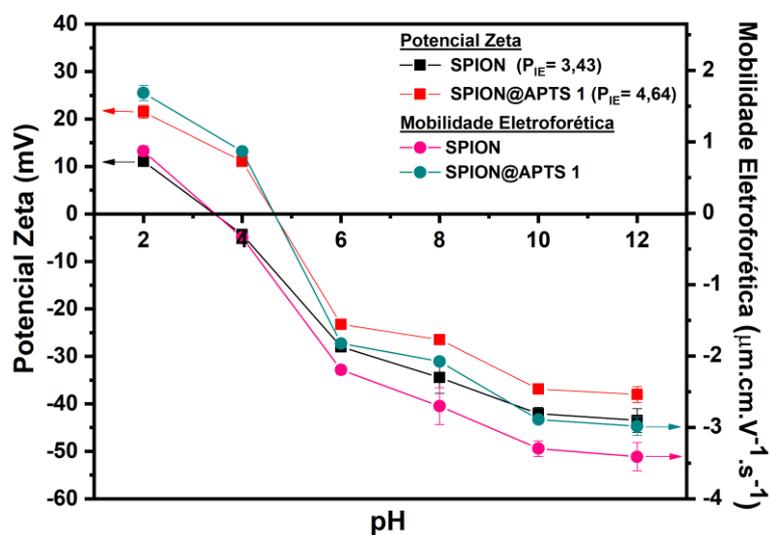
Figura 43 – Microscopia eletrônica de transmissão da modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com APTS (SPION@APTS 1).



Fonte: Autoria própria

O gráfico presente na Figura 44 mostra o comportamento eletroforético e da carga de superfície dos SPIONs modificados com APTS para amostra SPION@APTS 1 dispersa em solução aquosa, com eletrólito de suporte de cloreto de sódio 1×10^{-3} mol.L⁻¹, e a faixa de pH analisada foi de 2 a 12.

Figura 44 – Potencial Zeta e mobilidade eletroforética em função do pH dos SPIONs e após recobertos com APTS (SPION@APTS 1), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.

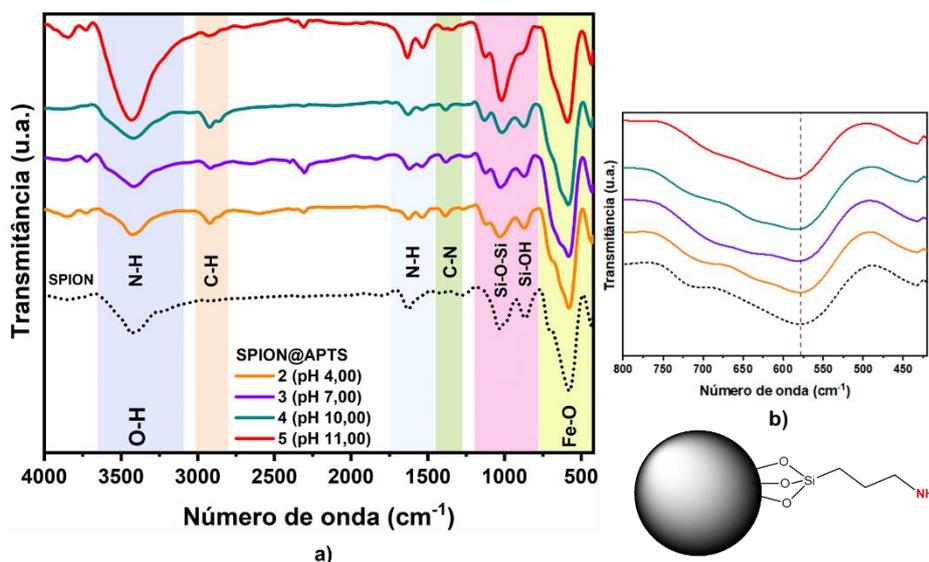


Fonte: Autoria própria

Na Figura 44 os dados de potencial zeta corroboram as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, confirmando que o recobrimento não ocorreu de forma efetiva, uma vez que o valor de potencial zeta variou ao redor de -25 mV na região de pH entre 6-8, onde reside a faixa de pH fisiológico. Desta forma, a estabilidade está próxima a região de estabilidade de curto prazo o que não é de interesse para o trabalho. Também o aumento do ponto isoelétrico ocorreu de forma discreta, variando de 3,43 para 4,64.

Para obter melhores resultados, variaram-se alguns parâmetros como relatados na Parte Experimental, que foram determinantes no controle do mecanismo de hidrólise e condensação dos silanos. Adaptou-se o procedimento realizado por Marciello (2013)⁷⁷ e ao invés de adicionar 0,3 mol/L de ácido nítrico como realizado na síntese anterior (SPION@APTS 1), controlou-se o valor de pH da solução contendo os SPIONs antes da adição do APTS, diminuindo também a proporção de SPION/APTS em dez vezes (1:5 m/m), pois se acredita que a formação de filmes sobre as partículas ocorreram devido ao excesso de silano. Os valores de pH foram ajustados para 4, 7 e 11 utilizando soluções de HCl e NaOH 1×10^{-3} mol/L, como também sem adição de catalisadores, utilizando o valor de pH da própria solução de SPIONs sendo ele igual a dez. Na Figura 45 são apresentados espectros FTIR para confirmar as ligações de silano na superfície dos SPIONs para as amostras variando o pH nos valores de 4 (SPION@APTS 2), 7 (SPION@APTS 3), 10 (SPION@APTS 4) e 11 (SPION@APTS 5), e as respectivas atribuições dos modos vibracionais encontra-se na Tabela 8.

Figura 45 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 2-5), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrada a estrutura do SPION modificado com APTS.



Fonte: Autoria própria

Tabela 8- Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 2-5.

Número de onda (cm⁻¹)	Modo de vibração SPION	Número de onda (cm⁻¹)	Modo de vibração SPION@APTS
708-578/432	ν_1/ν_2 Fe-O	692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O
3431	$\nu_{O-H,sim}$ e $\nu_{O-H,assim}$	3482	$\nu_{O-H,sim}/\nu_{O-H,assim}/\nu_{N-H,assim}$
1627	δ_{O-H}	16534-1527	$\delta_{N-H,assim}$
977-873	$\nu_{S=O}$	1127-1015-878	$\nu_{Si-O-Si}/\nu_{Si-O-H}$
		1235	ν_{Si-C}
		1384	δ_{C-N}
		2934	ν_{C-H}

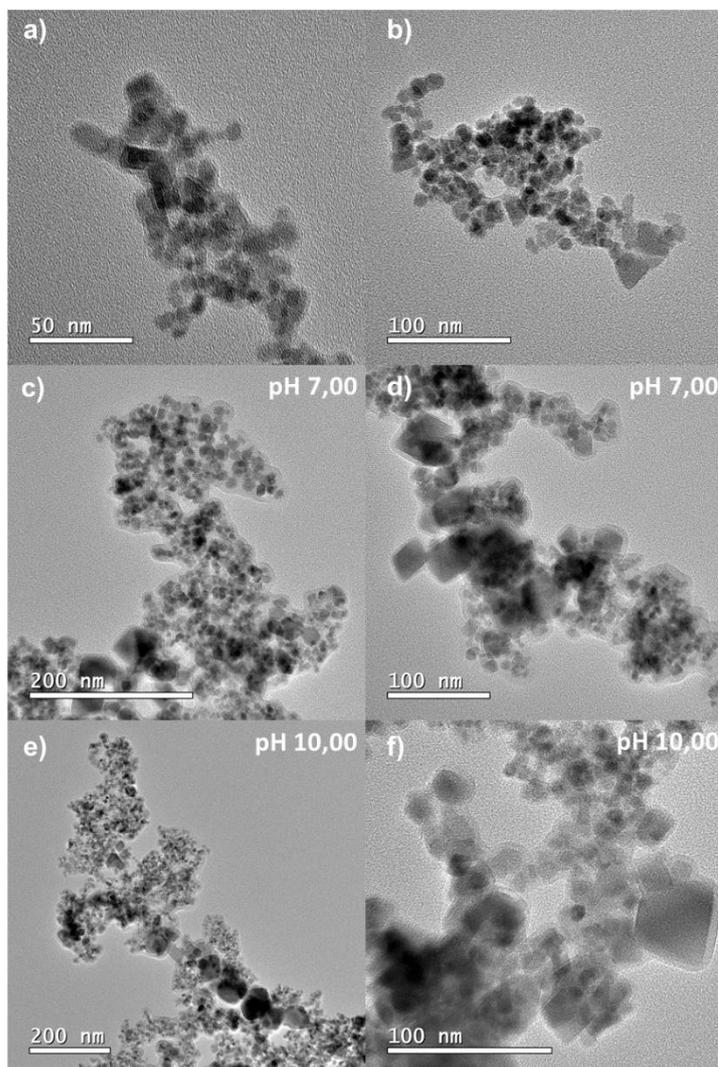
Fonte: Autoria própria

Nos espectros de absorção para diferentes valores de pH nota-se um leve deslocamento para maiores números de onda das bandas na região de 578 cm⁻¹ atribuída a ligação Fe-O-Si (Figura 45b). As bandas de absorção na região de 3418 a 3430 cm⁻¹ são atribuídas ao alongamento assimétrico da amina ($\nu_{assim N-H}$) e o duplete na região de 1630-1530 cm⁻¹ correspondente a deformação axial assimétrica do grupo amina livre (δ_{N-H}), como também o pico na região de 1370 a 1390 cm⁻¹ atribuído a vibração de deformação axial da ligação C-N, ambas ligações presentes da estrutura do APTS. As bandas em aproximadamente 2930-2855 cm⁻¹ caracterizam as vibrações de alongamento simétrico e assimétrico da ligação C-H. A banda referente a ligação

S=O presente na superfície dos SPIONs não está mais nos espectros das amostras SPION@APTS 2-5, no entanto apareceu na mesma região bandas em 1130 cm^{-1} referente ao estiramento Si-C e em $1015\text{-}870\text{ cm}^{-1}$ atribuídas a ligações Si-O-Si e Si-O-H¹²⁵.

As microscopias eletrônicas de transmissão das nanopartículas recobertas com APTS realizando estudo de pH estão presentes na Figura 46, exceto para o pH 11 que será discutido posteriormente. Em todas as amostras analisadas não houve formação de filme sobre as partículas como relatado anteriormente, isso pode ser atribuído a diminuição da concentração de APTS. Para amostra SPION@APTS 2 realizada em pH 4,00, nota-se que há regiões que foram recobertas (Figura 46a), como também regiões que aparentam não ter sido recobertas de maneira efetiva (Figura 46b). Já para amostra SPION@APTS 3, realizada em pH 7,00, mesmo após diminuir a concentração de silano, observa-se a formação de uma matriz polimérica em volta das partículas, o que leva a formação de agregados, não atingindo o objetivo esperado do trabalho (Figura 46c-d). Para a amostra SPION@APTS 4, sintetizada em pH 10, sendo o próprio pH do meio sem adicionar catalisador, apesar da camada de silano em volta das partículas ser um pouco espessa (Figura 46e-f). Esse resultado foi melhor quando comparado com os demais, na qual é possível observar que as partículas foram totalmente recobertas, e não houve a formação de uma cadeia polimérica extensa, sendo possível melhorar esses resultados, diminuindo ainda mais a concentração de APTS.

Figura 46 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a-b) SPION@APTS 2, c-d) SPION@APTS 3, e-f) SPION@APTS 4.



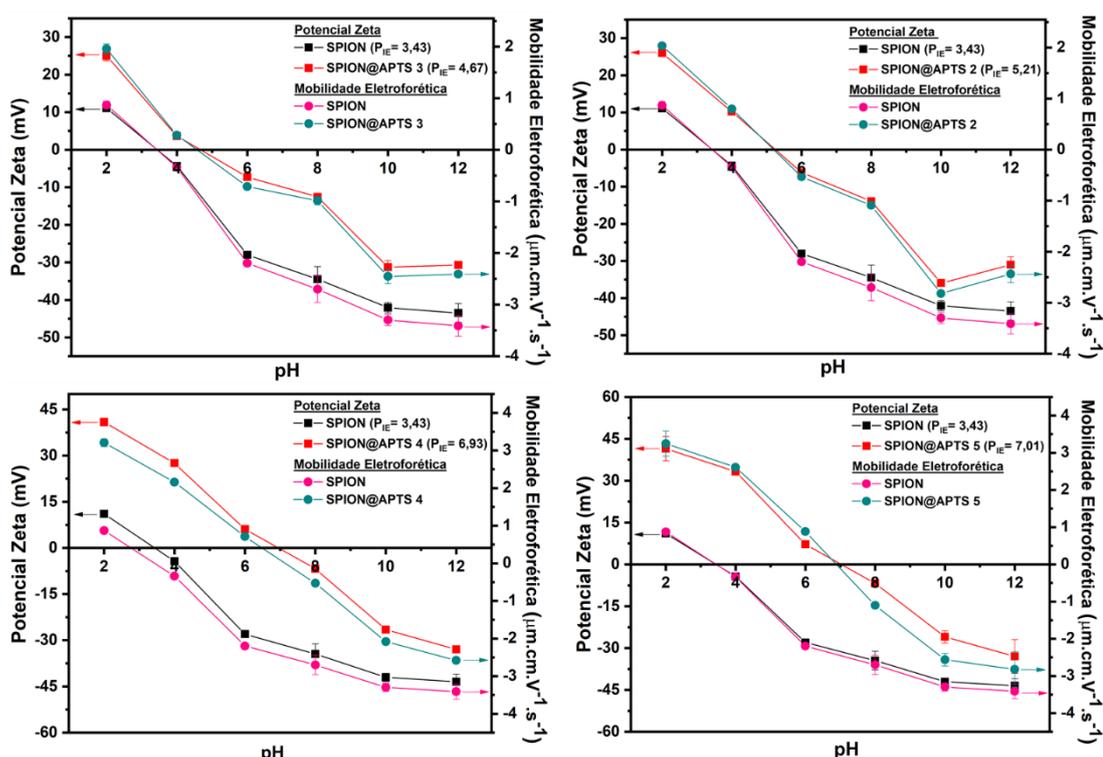
Fonte: Autoria própria

Embora as imagens mostrem o recobrimento em todas as partículas e um grau de aglomeração menor, é necessário um estudo mais aprofundado para confirmar a formação de agregados através de medidas do diâmetro hidrodinâmico realizadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). É difícil, para essas amostras, diferenciar a formação de agregados por conta da secagem do solvente, e por isso, as medidas de DLS serão fundamentais para elucidar essa questão. Tais medidas serão discutidas posteriormente, na qual será possível associar com a estabilidade coloidal dessas partículas.

A variação dos valores de potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH é mostrada na Figura 47. As amostras recobertas com amino-silano apresentaram comportamento eletroforético diferente da amostra sem funcionalizar

(SPION), confirmando que houve modificação na superfície das nanopartículas de magnetita.

Figura 47 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e com recobrimento variando o pH do meio de reação para 4 (SPION@APTS 2), 7 (SPION@APTS 3), 10 (SPION@APTS 4) e 11 (SPION@APTS 5), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.



Fonte: Autoria própria

De forma geral, as reações de polimerização com organossilanos para modificação da superfície das nanopartículas ocorrem de forma muito lenta sem utilizar catalisadores, tornando-a dependente do pH do meio de reação⁵⁵. Quando o meio de reação é ácido, a hidrólise do silano ocorre de forma muito rápida enquanto a condensação é muito lenta, já em meio básico ocorre o inverso, a taxa de hidrólise é muito mais lenta enquanto a taxa de condensação é muito mais rápida⁵⁵⁻⁵⁷.

Na Figura 47, observa-se que os valores do potencial zeta são significativamente modificados quando o recobrimento se deu em meio alcalino. O recobrimento efetivo de toda a superfície das nanopartículas com APTS deve levar o ponto isoelétrico para valores de pH ao redor de 7, considerando que o APTS possui pK_a de aproximadamente 10,6. Em meio ácido, o grupo amino terminal permanece protonado conferindo carga positiva a superfície das nanopartículas. Com o aumento do pH, ocorre uma maior concentração de íons hidroxila no meio, os quais vão

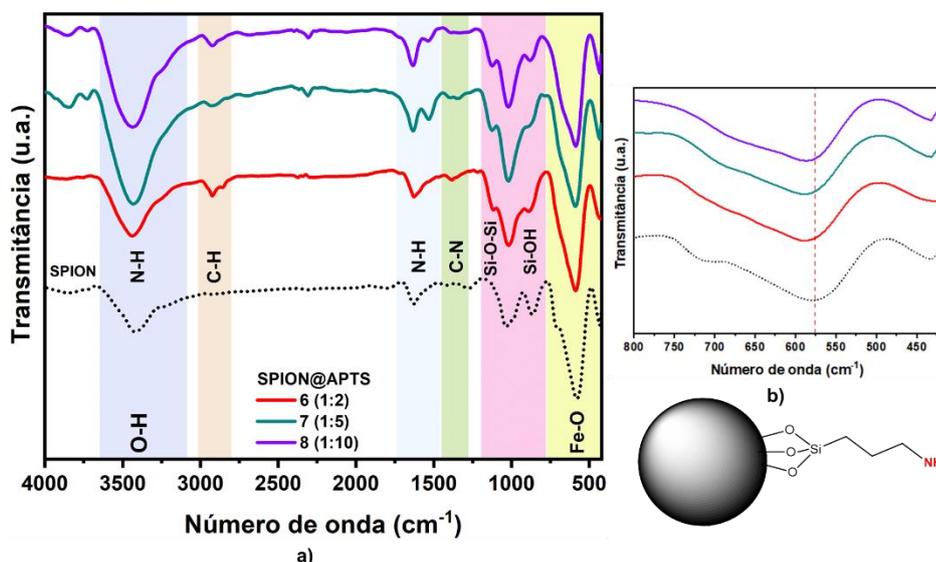
gradativamente neutralizando as cargas positivas do grupo amino protonado. Ao redor de pH 7, a quantidade de íons hidroxila e de grupos protonados na superfície das nanopartículas se equivalem, resultando no ponto isoelétrico. Passando para valores alcalinos, a quantidade de íons hidroxila próximos à superfície da nanopartícula aumenta gradativamente, conferindo valores negativos de potencial de superfície, até que se atinja um equilíbrio (patamar na curva de potencial *versus* pH) onde os processos difusionais mantêm a carga de superfície praticamente constante.

As amostras cujo recobrimento se deu em pH ácido ou neutro, respectivamente SPION@APTS 2 (pH 4) e SPION@APTS 3 (pH 7), apresentam valores de ponto isoelétrico (P_{IE}) mais próximos àqueles observados para os SPIONs sem recobrimento, se encontrado ao redor de $P_{IE} \sim 5$, o que pode indicar a presença de nanopartículas não recobertas ou menor densidade de moléculas presentes no recobrimento. Para a amostra SPION@APTS 2, embora seja esperado uma taxa de hidrólise elevada por conta do pH ácido, a taxa de condensação é minimizada o que pode interferir diretamente na quantidade de moléculas de APTS efetivamente ligadas à superfície das nanopartículas. Se restarem grupos silanóis livres, devido à baixa condensação, estes podem contribuir para a presença de cargas positivas e o abaixamento do P_{IE} ^{56,57}. No caso da amostra SPION@APTS 3, a explicação é parecida, levando-se em conta que em pH neutro, tanto a velocidade de hidrólise quanto à taxa de condensação são lentas⁵⁵⁻⁵⁷. O grupo amino presente na estrutura do APTS pode conduzir a própria reação das moléculas de organossilano para formação dos siloxanos, pois, o APTS auto-catalisa sua própria hidrólise e condensação devido ao seu caráter básico em solução aquosa ($pK_a=10,6$). Assim, o mesmo hidrolisa e polimeriza espontânea e completamente em poucos minutos na presença de água e menos rapidamente na presença de solvente orgânico, por isso, é importante manter a proporção água/metanol 1:1, uma vez que a polimerização/condensação do APTS somente em água ocorre de maneira amplamente descontrolada^{50,58}. Para as amostras SPION@APTS 4 e SPION@APTS 5, ambas recobertas em pH alcalino, respectivamente pH 10 e pH 11, a velocidade de hidrólise do APTS é baixa, com maior taxa de condensação. Essas condições permitem controlar melhor o processo de recobrimento e aumenta a eficiência das ligações dos grupos silanóis tanto com a superfície das nanopartículas quanto em reações laterais (com outros grupos silanóis próximos), elevando o valor do P_{IE} .

Em relação à estabilidade coloidal, a adição de APTS, como esperado, não contribuiu para a melhoria da dispersibilidade dos SPIONs em meio aquoso, entre os pH 6-8, região em que se encontra o pH fisiológico (ao redor de 7,4). Se o recobrimento é menos efetivo, como no caso das amostras SPION@APTS 2 e SPION@APTS 3, os valores de potenciais são influenciados pelas características da superfície das próprias nanopartículas, permanecendo com valores negativos de potencial, variando-se entre aproximadamente -5 mV até -20 mV, conferindo-lhe baixa estabilidade. Para as amostras SPION@APTS 4 e SPION@APTS 5, onde os dados sugerem um recobrimento efetivo, a estabilidade é ainda menor, com os potenciais variando na faixa cerca de +8 mV até -8 mV. A finalidade do grupo amino-terminal em moléculas pequenas como o APTS é aumentar a biocompatibilidade da superfície dos SPIONs devido à menor toxicidade e, efetivamente, ser utilizado como uma molécula intermediária para funcionalizações adicionais. Espera-se que ao funcionalizar essas partículas com o ácido fólico diminua o potencial, e assim, obter um melhor controle de estabilidade em razão das repulsões eletrostáticas dos grupos carboxílicos como também repulsões estéricas.

Com base nos dados obtidos pelo estudo de pH e notando a melhora dos resultados ao diminuir a concentração de silano, realizou-se um novo estudo variando a proporção SPION/APTS fixando as reações em pH = 11. Ainda utilizando como base o trabalho de Marciello (2009)⁷⁷, e agora considerando o pH otimizado como 11, variou-se a proporção SPION/APTS (m/m) em 1:2 (SPION@APTS 6), 1:5 (SPION@APTS 7) e 1:10 (SPION@APTS 8). Os espectros FTIR das amostras recobertas variando a proporção SPION/APTS (SPION@APTS 6-8) são apresentados na Figura 48 e as atribuições dos modos vibracionais estão presentes na Tabela 9.

Figura 48 - Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com APTS (SPION@APTS 6-8), b) Recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS.



Fonte: Autoria própria

Tabela 9 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@APTS 6-8.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@APTS
708-578/432	ν_1/ν_2 Fe-O	692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O
3431	ν O-H,sim e ν O-H,assim	3482	ν O-H,sim/ ν O-H,assim/ ν N-H,assim
1627	δ O-H	1634-1527	δ N-H,assim
977-873	ν S=O	1127-1015-878	ν Si-O-Si / ν Si-O-H
		1235	ν Si-C
		1384	δ C-N
		2934	ν C-H

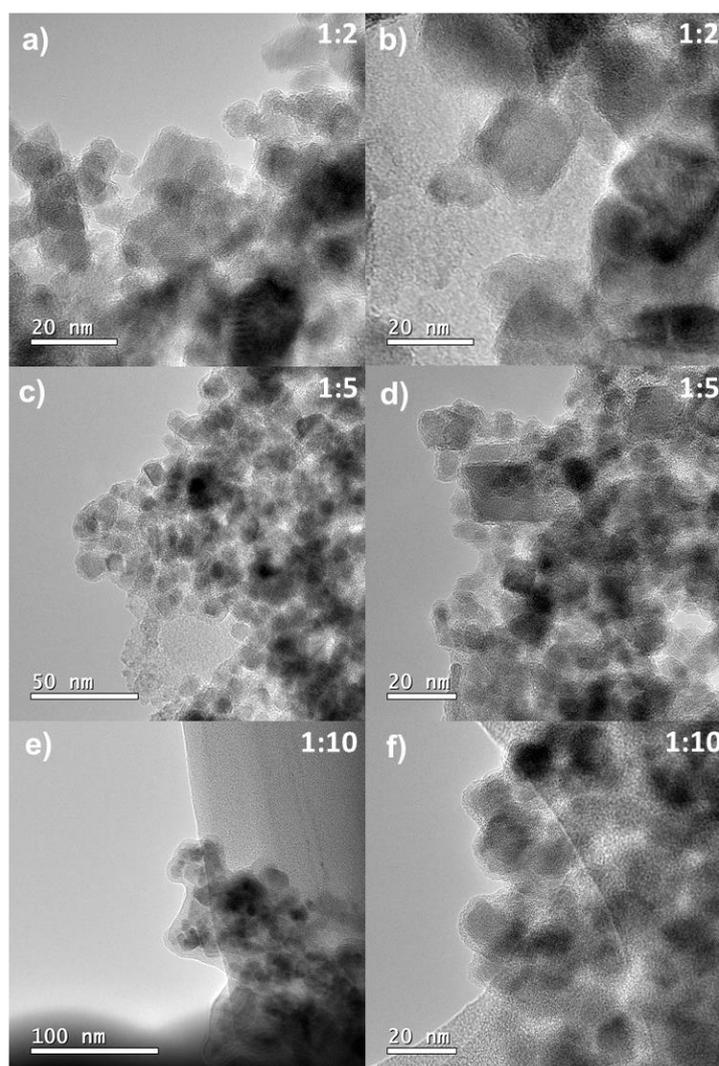
Fonte: Autoria própria

Para todos os espectros de absorção apresentados na Figura 48 nota-se a presença das ligações características da modificação de superfície dos SPIONs com as moléculas de APTS, como discutido anteriormente.

As microscopias eletrônicas de transmissão (MET) para o estudo de concentração (SPION@APTS 6-8) estão presentes na Figura 49, na qual se observa um aumento proporcional da camada de silano na superfície das partículas com o aumento da concentração. Para a amostra SPION@APTS 6 (Figura 49a-b), síntese realizada na proporção 1:2, houve a formação de uma fina camada de organossilano em volta das partículas, diferentemente das sínteses discutidas anteriormente. Não

se verificou a formação de uma matriz polimérica em um agregado de partículas, indicando que recobrimento ocorreu de forma efetiva e individualmente. Para amostra SPION@APTS 7 (Figura 49c-d), já discutida anteriormente no estudo de pH, em que a síntese foi sucedida em pH 11 e proporção 1:5 (SPION@APTS 5), o recobrimento aconteceu de forma eficaz, corroborando os dados relatados nas medidas de potencial zeta, porém, uma larga camada de polímero foi formada em volta das partículas, comprovando que menores concentrações de silano favorece o recobrimento individual das partículas. Para amostra SPION@APTS 8 (Figura 49e-f), como esperado, ao aumentar a concentração do silano na proporção SPION/APTS 1:10, houve um aumento na densidade da camada de polímero formada, aglomerando as partículas em uma matriz polimérica.

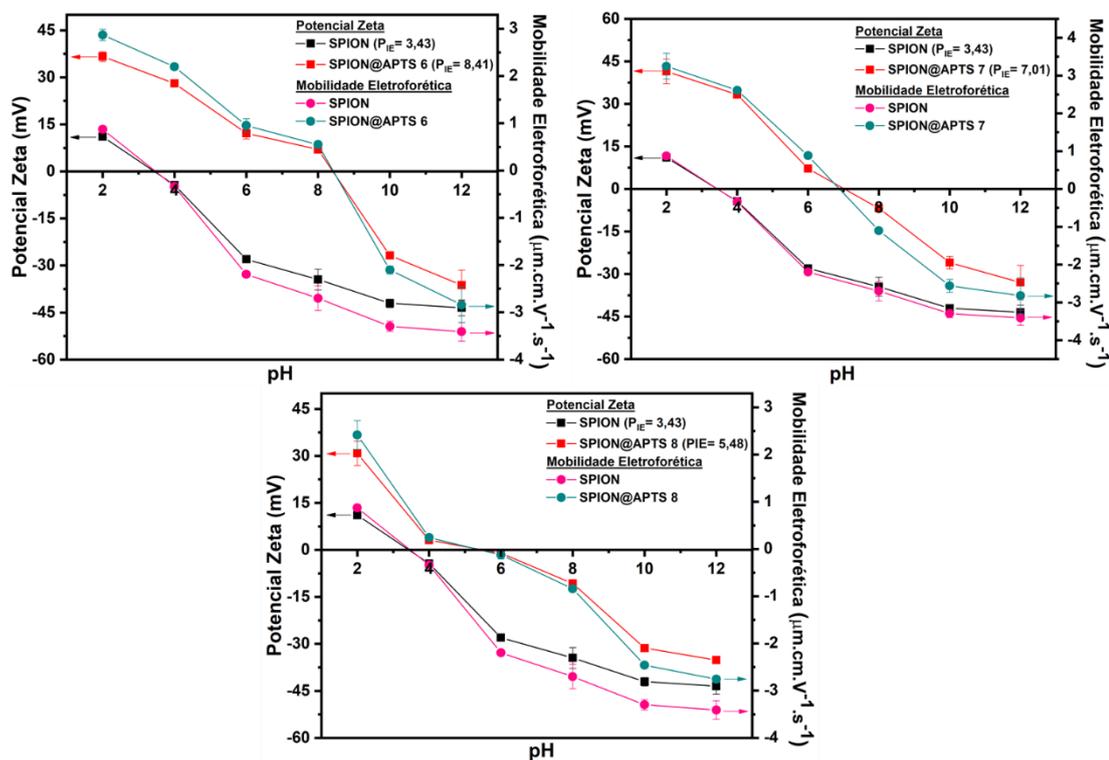
Figura 49 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a-b) SPION@APTS 6, c-d) SPION@APTS 7, e-f) SPION@APTS 8.



Fonte: Autoria própria

As medidas de variação dos valores de potencial zeta e da mobilidade eletroforética em função do pH, para estudo da modificação de superfície variando a concentração de silano (SPION@APTS 6-8) estão presentes na Figura 50.

Figura 50 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e recobertas com APTS em pH 11 variando a proporção SPION/APTS em 1:2 (SPION@APTS 6), 1:5 (SPION@APTS 7), 1:10 (SPION@APTS 8), dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.



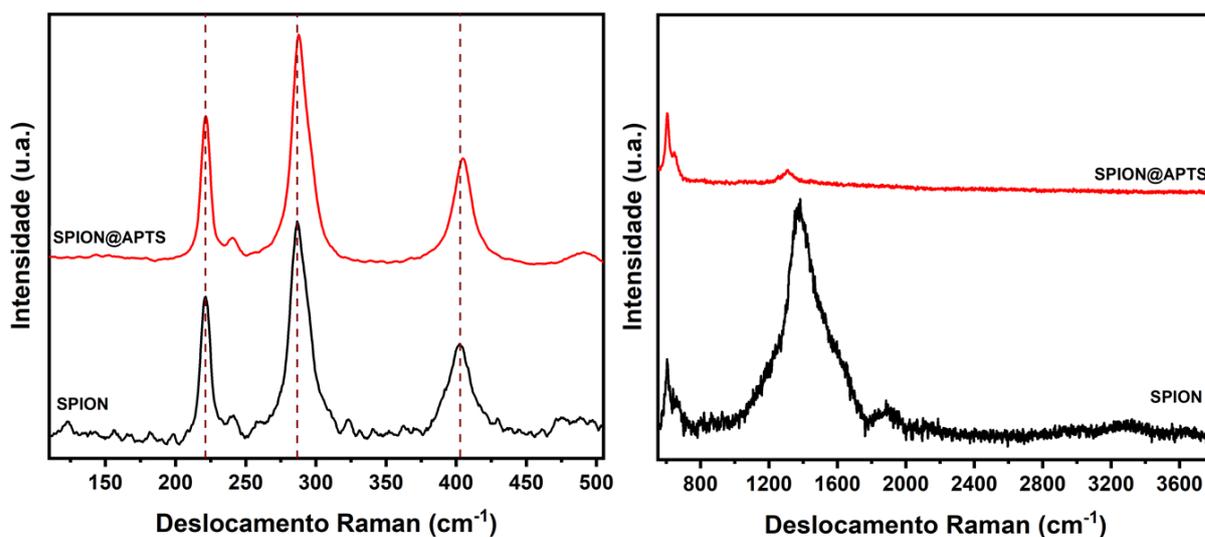
Fonte: Autoria própria

Conforme as medidas experimentais obtidas pelas análises de potencial zeta, os pontos isoelétricos para as amostras SPION@APTS 6, SPION@APTS 7 e SPION@APTS 8 foram 8,41, 7,01 e 5,48, respectivamente, havendo melhora significativa dos resultados ao diminuir a proporção SPION/APTS (m/m). Nota-se que quanto maior a proporção SPION/APTS, menor é o ponto isoelétrico, ou seja, menos efetivo foi o recobrimento, como foi possível observar nas imagens obtidas por TEM e analisadas anteriormente com a proporção 50:1, na qual houve a formação de filmes ou de agregados de partículas recobertas, como também regiões sem recobrimento. Os dados presentes na Figura 50 corroboram as imagens por TEM discutida anteriormente (Figura 49), onde para a amostra SPION@APTS 6, de proporção 1:2, o P_{IE} foi superior quando comparado com as demais amostras estudadas até o momento, formando um fino recobrimento de silano sobre a superfície das partículas de SPIONs

individualmente. Para as amostras SPION@APTS 7 e SPION@APTS 8 a camada de silano aumentou com o aumento de concentração de silano, sendo compatível com a diminuição do P_{IE} das respectivas amostras. A estrutura do organossilano possui o grupo amino terminal que apresenta caráter básico, podendo formar ligações de hidrogênio com outras moléculas de amino-silano, conforme mostrado esquema apresentado na Figura 41. Em maiores concentrações de APTS há um favorecimento para o aumento dessas interações, levando à policondensação do polímero, desfavorecendo a formação de monocamadas de interesse, contribuindo para a formação de agregado e diminuindo a estabilidade coloidal das partículas. Conseqüentemente menos grupos de caráter básico ficam disponíveis, com isso os pontos isoelétricos são menores e a diferença da partícula com e sem recobrimento é mínima. Menores proporções, silano/nanopartículas favorece o recobrimento individual das partículas e a presença de mais grupos amino disponíveis acarreta aumento do ponto isoelétrico, tornando-se viável para etapas posteriores de acoplamento com ácido fólico.

A análise de espectroscopia Raman da amostra de SPIONs recobertas com APTS (SPION@APTS) foi realizada para averiguar a modificação na superfície das nanopartículas, e encontra-se na Figura 51, na qual foi dividida em duas regiões, de 110 a 510 cm^{-1} e de 560 a 3800 cm^{-1} , e as respectivas atribuições dos deslocamentos Raman estão presentes na Tabela 10.

Figura 51 – Espectro Raman da amostra antes do recobrimento (SPION) e após recoberta com APTS (SPION@APTS) utilizando laser 785 nm e intensidade de 100%.



Fonte: Autoria própria

Tabela 10 – Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com APTS.

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION	Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION@APTS
	100%		100%
221	Hematita	221	Hematita
241	Hematita	240	Hematita
286	Hematita	287	Hematita
402	Hematita	404	Hematita
488	Hematita	492	Hematita
604	Hematita	604-645	Hematita
1382	Hematita	1308	Hematita

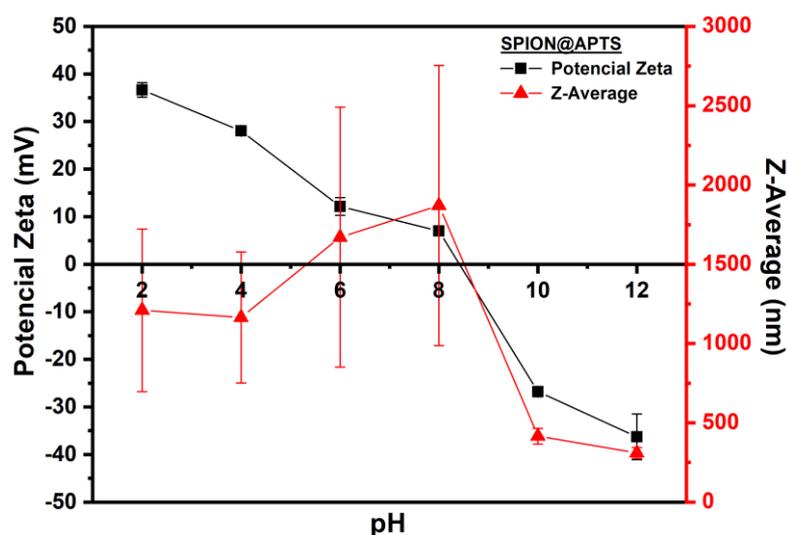
Fonte: Autoria própria

O espectro Raman obtido para amostra SPION@APTS é muito semelhante ao da amostra sem recobrimento (SPION). Na amostra recoberta (linha vermelha) também houve a conversão do óxido de ferro de magnetita em maghemita e subsequentemente em hematita, como já explicado anteriormente. O laser utilizado foi de 785 nm, e intensidade do laser utilizado para ambas as amostras foi de 100%. Contudo, observa-se que para amostra recoberta com APTS, o modo vibracional centrado em 1382cm⁻¹ possui intensidade menor, indicando que houve uma menor conversão da fase estrutural da magnetita, sugerindo que a modificação da superfície com organossilano pode melhorar a estabilidade dos SPIONS¹⁰¹ e prevenir processos oxidativos na superfície das partículas. O deslocamento Raman de algumas bandas na amostra SPION@APTS pode ser atribuído a ligação covalente dos silanos na superfície das partículas.

Na Figura 52 é constatado a analogia entre os valores de potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) em função do pH para amostra SPION@APTS 6, considerando a relação da carga de superfície e a sua dependência com o pH. O pH do ponto isoelétrico (P_{IE}) dessa amostra é de ~8,41, ou seja, nessa região a somatória das cargas da superfície das partículas é igual a zero. Com isso, não há forças eletrostáticas estabilizando a partícula, sendo uma região instável e com alto grau de sedimentação, acrescido da circunstância do organossilano possuir grupos amino-terminais que podem realizar interações de hidrogênio, contribuindo ainda mais para o processo de agregação. Para pH abaixo do ponto isoelétrico (< 8,41) os grupos amino-terminais encontram-se protonados (-NH₃⁺), e a carga da superfície é positiva¹²⁶. Apesar dos valores de potencial zeta para os pH 2 e 4 estarem dentro da faixa de estabilidade, observa-se um grande tamanho hidrodinâmico das partículas.

Novas interações intermoleculares podem ocorrer na presença do íon H^+ , afetando a estabilidade coloidal e consequentemente o valor de Z-Average, e essa instabilidade é constatada nos altos valores dos erros. Para os pH 6 e 8, região próxima ao P_{IE} , os valores de potencial zeta estão na faixa de baixa estabilidade coloidal, consequentemente os valores de Z-Average são maiores, indicando a formação de grandes aglomerados de partículas recobertas, refletindo em uma medida de erro extensa. Em pH superior ao do ponto isoelétrico (pH 10 e 12) predomina o caráter básico dos grupos amina ($-NH_2$), ocorrendo repulsão eletrostática com os íons hidroxilas (OH^-) presente na solução, que também possuem carga negativa, resultando em menores tamanhos hidrodinâmicos em razão de uma melhor estabilidade das partículas, que pode ser verificado pelo baixo valor do erro.

Figura 52 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico *versus* pH da amostra SPION@APTS.

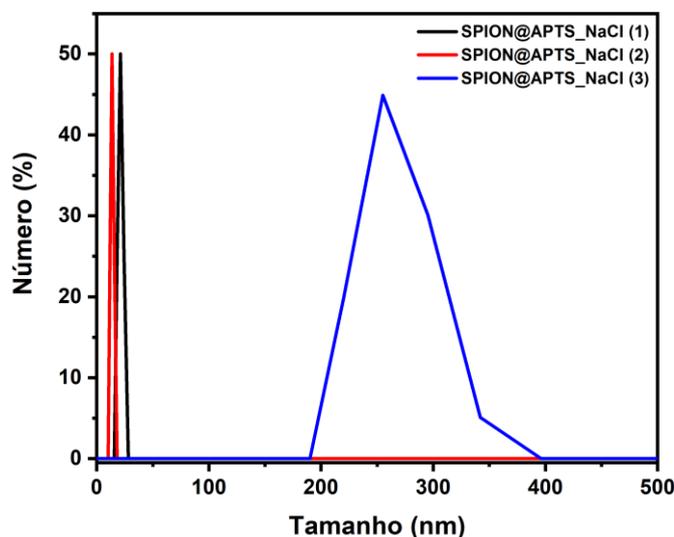


Fonte: Autoria própria

Uma das finalidades do recobrimento das nanopartículas de magnetita com organossilano para aplicação biológica, é minimizar a alta energia de superfície decorrente do seu pequeno tamanho, para prevenir a agregação. Entretanto como discutido anteriormente, a faixa de pH para obter a estabilidade coloidal das partículas modificadas com amino-silano é em torno de 10-12, ou seja, torna-se inviável para a aplicação direta em sistemas biomédicos. Entretanto, é um processo intermediário para o acoplamento da molécula de ácido fólico, que poderá melhorar a estabilidade dessas nanopartículas, por meio de repulsões eletrostáticas e estéricas. Esse comportamento instável para as SPIONs modificadas com o APTS, pode ser

observado nas curvas de distribuição de tamanho em função do número de partículas, obtidas pela análise de DLS e apresentados na Figura 53.

Figura 53 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@APTS 6.

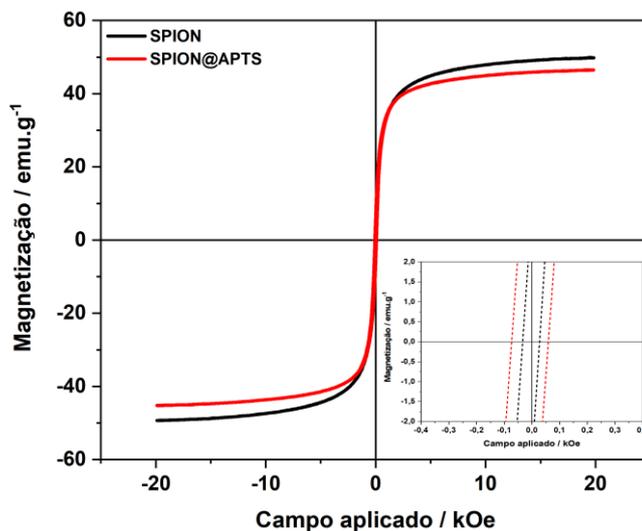


Fonte: Autoria própria

A primeira e a segunda curva de distribuição de tamanho das partículas recobertas com APTS, apresentaram uma distribuição estreita. Esse tipo de distribuição é característico de partículas grandes, na qual não conseguem se locomover rapidamente como as partículas pequenas, obtendo-se um sinal estreito. Contudo, ao iniciar a primeira corrida, a amostra SPION@APTS 6 já havia floculado e decantando, portando a primeira curva de distribuição obtida (linha preta) foi apenas das partículas que ainda se encontrava dispersa em solução. Ressalta-se que 50% do número de partículas está distribuído nessa estreita faixa de tamanho, com o valor de PDI cerca de 1, confirmando a elevada polidispersividade. Esse comportamento é comprovado pela segunda curva de distribuição (linha vermelha), em que 50 % do número de partículas que ainda estavam dispersas em solução, estava deslocado para menor número de tamanho, indicando que mais partículas decantaram, permanecendo com alto grau de polidispersividade. Por fim, a terceira corrida (linha azul) mostra que houve uma dissolução dos floculados decantados, e o aparecimento de uma larga distribuição de tamanho dos agregados em torno de ~280 nm. Esse comportamento era esperado, pois as análises foram realizadas em solução aquosa, ou seja, pH ~7, região próxima do ponto isoelétrico dessas partículas, onde apresenta uma baixa estabilidade coloidal e com alta tendência de se aglomerarem. Outro fator que pode ter contribuído para que ocorresse maior formação de agregados, é a alta

concentração de partículas em solução. Acredita-se que com a diminuição da concentração, poderia diminuir a formação de grandes agregados, porém, não houve tempo hábil para realizar o ajuste desse parâmetro por conta da Pandemia

Figura 54 - Curva de magnetização de saturação da magnetita recoberta com APTS (SPION@APTS).



Fonte: Autoria própria

Também foi realizada a análise de VSM para a amostra SPION@APTS 6 a fim de verificar se houve mudança do comportamento magnético dos SPIONs após a modificação da superfície pelo APTS. Na Figura 54 observa-se a curva de magnetização vs campo magnético aplicado, onde o valor de magnetização de saturação para amostra SPION@APTS 6 foi de $46,5 \text{ emu.g}^{-1}$, que é ligeiramente menor do que da amostra sem recobrimento (50 emu.g^{-1}). Esse menor valor pode ser atribuído aos efeitos de superfície pela presença do silano, além do fato de se introduzir uma material diamagnético no sistema, o qual não contribui para a magnetização¹²⁷. Além disso, as curvas de magnetização dependentes de campo apresentaram um leve aumento no valor do valor de coercividade, de $0,03 \text{ kOe}$ para $0,05 \text{ kOe}$. Esses resultados ainda permitem considerar que os valores de coercividade (H_c) e remanência (M_r) são desprezíveis, indicando que mesmo após o recobrimento as nanopartículas ainda apresentaram um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente.

4.3.2. Modificação com 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (SPION@MPTMS)

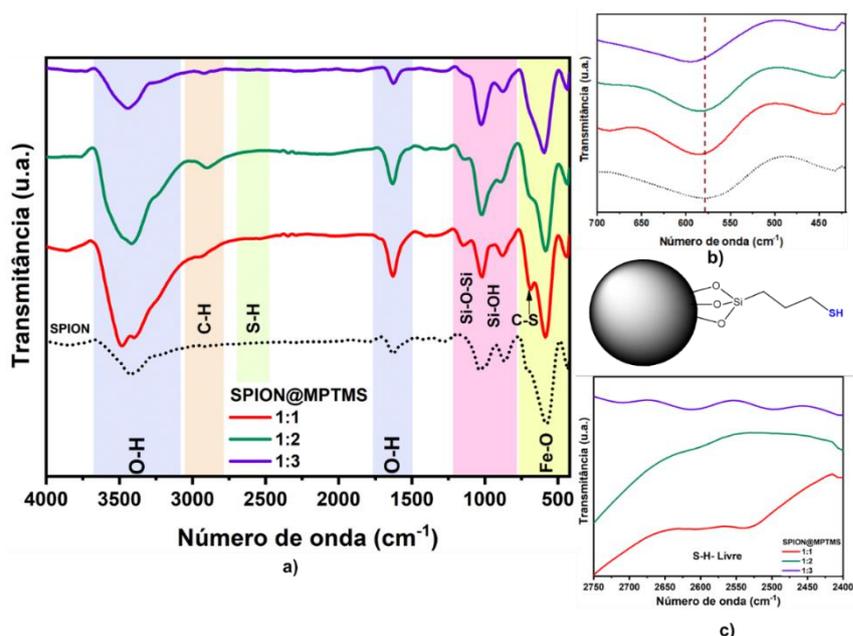
O uso do (3-mercaptopropil)trimetóxisilano como agente de modificação direta de superfície dos SPIONs é pouco relatado na literatura, principalmente para

funcionalização com ácido fólico para aplicação teranóstica. Compreendendo a necessidade de estudos nessa área, o MPTMS foi um dos organossilanos selecionado para esse trabalho. O MPTMS é muito sensível à umidade, dificultando a modificação da superfície por apresentar problemas de homogeneidade e reprodutibilidade¹²⁸, uma vez que a presença de água é essencial para a catálise de hidrólise e condensação de silanos^{55,57,122}. Outro problema é a fácil oxidação dos tióis na presença da atmosfera de oxigênio, formando ligações dissulfeto^{129,130}, ou ao ficar exposto em ar por período prolongado, podem ser oxidados a sulfonatos¹²⁸, diminuindo a densidade de grupos mercapto disponíveis para etapas posteriores. Os tióis-silano, como o MPTMS, apresentam comportamento ácido devido seu caráter eletrofílico, e por dispor de grupo funcional (-SH) altamente aniônico¹³¹, proporciona uma melhor estabilidade coloidal quando comparado com os amino-silanos (APTS), que possuem comportamento básico (nucleofílico) e com o ponto isoelétrico (região de menor estabilidade), próximo da faixa de pH para aplicação biológica.

A metodologia utilizada nessa etapa foi baseada no trabalho de Pallavicini (2015)⁸⁰, com os parâmetros de síntese próximo ao que foi utilizado para o recobrimento com o APTS. A hidrólise e condensação para o tiol-silano foi controlada por catálise básica (pH=9), com a proporção água/etanol 1:2 (v/v), menor tempo de reação (7 horas), necessitando de atmosfera inerte (N₂) para prevenir a oxidação do grupo tiol e variando as proporções SPION/MPTMS (m/m) em 1:1 (SPION@MPTMS 1), 1:2 (SPION@MPTMS 2) e 1:3 (SPION@MPTMS 3)

Para identificar a modificação covalente da superfície dos SPIONs pelo MPTMS, realizou-se a espectroscopia FTIR das amostras em diferentes concentrações de SPION/MPTMS (SPION@MPTMS 1-3), presente na Figura 55 e suas respectivas atribuições na Tabela 11.

Figura 55 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes (SPIONs) e após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTMS 1-3), b) Recorte na região da ligação Fe-O, c) Recorte na região da ligação S-H. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com MPTS.



Fonte: Autoria própria

Tabela 11 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION e SPION@MPTMS 1-3.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@MPTMS
708-578/432	ν_1/ν_2 Fe-O	692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O
3431	$\nu_{O-H, sim}$ e $\nu_{O-H, assim}$	3484	$\nu_{O-H, sim}/ \nu_{O-H, assim}/ \nu_{Si-O-H}$
1627	δ_{O-H}	1629	δ_{O-H}
977-873	$\nu_{S=O}$	1161-1056-880	$\nu_{Si-O-Si} / \nu_{Si-O-H}$
		2539	ν_{S-H}
		689	δ_{C-S}
		2935	ν_{C-H}

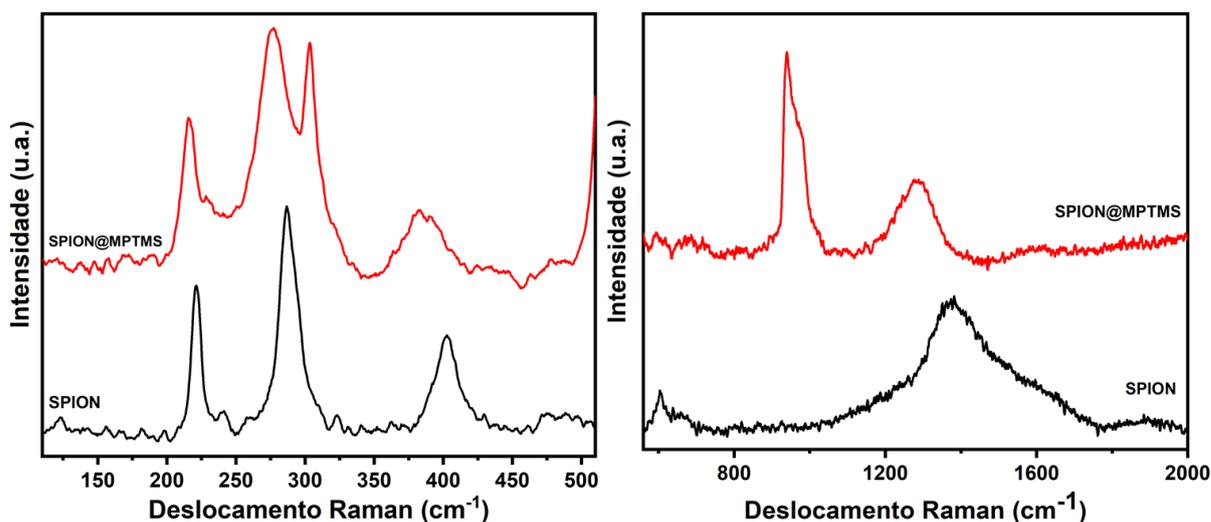
Fonte: Autoria própria

Para o espectro FTIR da amostra de SPION presente na Figura 55a, duas bandas na região de 708-578 e 432 cm⁻¹, de forte e pequena intensidade, são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos ν_1 e ν_2 da ligação Fe-O da magnetita. Após o recobrimento com o MPTMS, houve deslocamento dessas bandas para menores números de ondas, em torno de 692-588 e 431 cm⁻¹ (Figura 55b), resultante da modificação da superfície devido à ligação covalente Fe-O-Si e a formação da camada de silano¹³². A banda referente à vibração de flexão assimétrica e simétrica

da ligação siloxano (Si-O-Si), encontra-se, respectivamente, na região de 1161-1056 e 880 cm^{-1} , na qual a banda de silanol (Si-OH) proveniente de silanos não ligados à superfície, encontra-se sobreposta a larga banda de vibração do alongamento Si-O-Si. Os silanóis também possuem vibração de alongamento na mesma região de estiramento simétrico e assimétrico da ligação O-H na região de 3484 cm^{-1} , proveniente de água fisissorvida pelos silanos presentes na superfície das nanopartículas modificadas^{131,133}, além da banda de deformação na região de 1629 cm^{-1} . A banda típica na região de 2935 cm^{-1} é atribuída aos alongamentos simétricos e assimétricos da ligação C-H, procedente da cadeia de alcano presente em todos alcoxissilanos¹³². A presença do grupo tiol na superfície dos SPIONs pode ser identificada pelas bandas em 689 cm^{-1} , atribuída ao alongamento assimétrico da ligação C-S e em torno de 879 cm^{-1} associada à vibração de flexão de S-H, na qual deve estar sobreposta na mesma região da ligação Si-O-Si¹³³. Outra banda com intensidade muito fraca utilizada para identificação do grupo mercapto está presente na região de 2536 cm^{-1} , e pode ser melhor observada no recorte apresentado na Figura 55c^{131,133,134}.

Apesar de a técnica FTIR ser qualitativa, o que impossibilita afirmar se o recobrimento ocorreu de forma efetiva e uniforme, na Figura 55 é possível observar que o espectro da amostra SPION@MPTMS 1 está melhor definido, principalmente para as bandas características do grupo tiol (C-S e S-H), entretanto é necessário técnicas complementares para afirmar o melhor parâmetro, como será discutido posteriormente.

Figura 56 - Espectros Raman das amostras de óxidos de ferro recobertos com MPTMS.



Fonte: Autoria própria

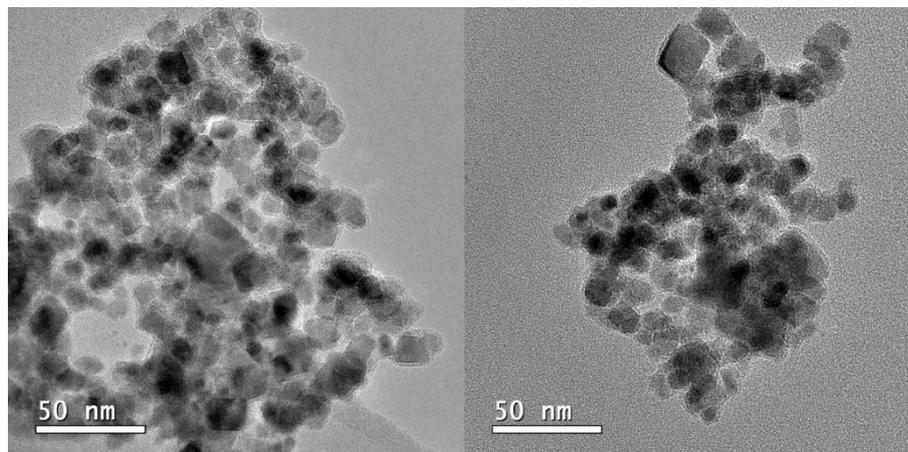
Tabela 12 - Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com MPTMS.

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION	Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION@MPTMS
	100%		100%
221	Hematita	215	Hematita
241	Hematita	277	Hematita
286	Hematita	303	Magnetita
402	Hematita	383	Hematita
488	Hematita	478	Hematita
604	Hematita	593	Hematita
1382	Hematita	675	$\nu(\text{C-S})$
		938	$\rho(\text{C-H})$
		1288	$\delta(\text{C-H})$

Fonte: Autoria própria

O espectro Raman da amostra modificada com o tiol-silano (Figura 56), é semelhante ao da amostra de SPION antes do recobrimento, realizadas nas mesmas condições (laser 785 nm com intensidade de 100%). A análise apresentou as mesmas bandas (Tabela 12), porém deslocadas para 215, 277, 383, 478 e 593 cm⁻¹, e são atribuídas à mudança de estrutura da magnetita em hematita, por conta do aquecimento provocado pela alta intensidade do laser. Na amostra SPION@MPTMS, nota-se o aparecimento do deslocamento Raman na região de 303 cm⁻¹, referente a estrutura da magnetita, sugerindo que a presença da camada de silano em torno das partículas impossibilitou a total conversão de fase do óxido de ferro, na qual pode-se afirmar que a presença do recobrimento pode melhorar a estabilidade dos SPIONs e prevenir a oxidação da superfície das partículas¹⁰¹. A banda de deslocamento de baixa intensidade que caracteriza a presença do tiol na superfície das partículas está presente na região de 675 cm⁻¹, e é atribuída ao alongamento da ligação C-S^{130,135}. Outras bandas de alta intensidade que indicam a presença do organossilano recobrindo as nanopartículas encontra-se na região de 938 e 1288 cm⁻¹, e são atribuídas ao modo de vibração de flexão assimétrica no plano¹³⁶ e ao modo de curvatura^{130,137} das ligações C-H.

Figura 57 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para amostra de SPION recoberta com MPTMS (SPION@MPTMS 1).

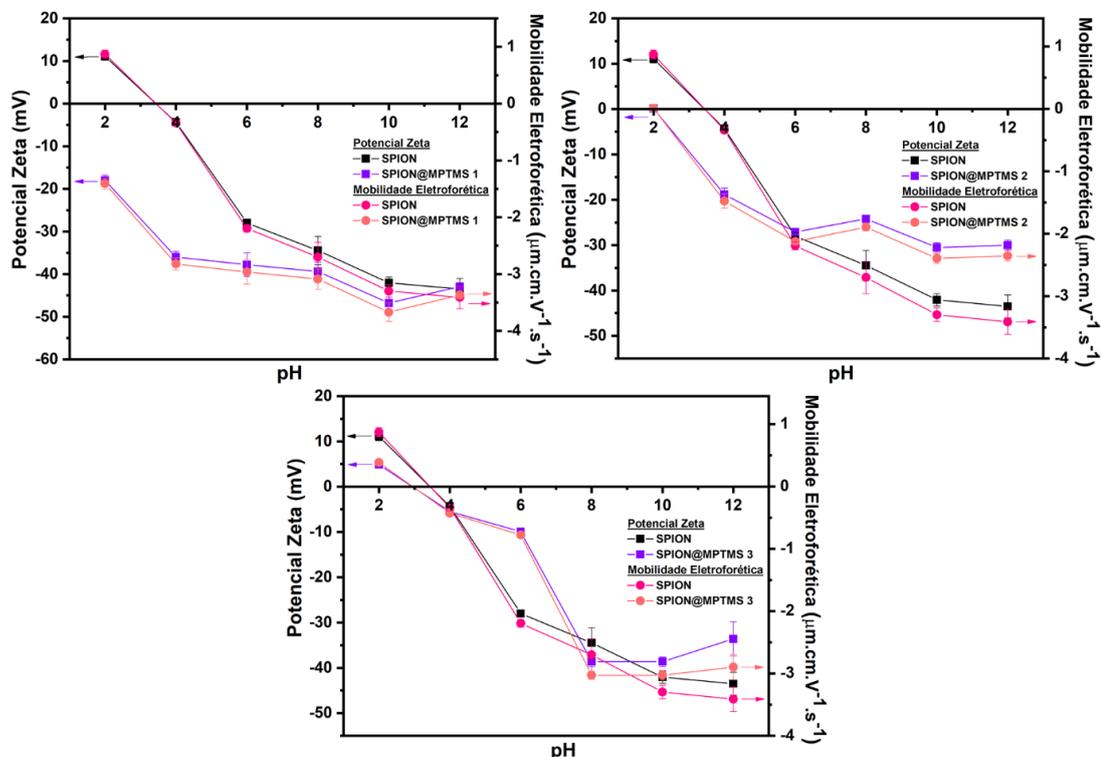


Fonte: Autoria própria

Na Figura 57, pode-se observar que o recobrimento dos SPIONs com MPTMS para amostra SPION@MPTMS 1 ocorreu de forma efetiva, formando uma fina camada de tiol-silano em torno de partículas individuais e sem a formação de uma matriz polimérica em torno de um agregado de partículas, atingindo o objetivo do trabalho. Apesar de nas imagens as partículas estarem relativamente agregadas, o que é esperado devido a secagem do solvente, nota-se que houve uma melhora na dispersão das nanopartículas quando comparada com as imagens dos SPIONs antes do recobrimento.

As medidas de variação dos valores de potencial zeta e da mobilidade eletroforética em função do pH, para estudo da modificação de superfície variando a concentração de tiol-silano (SPION@MPTMS 1-3) estão presentes na Figura 58.

Figura 58 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION) e recobertas com MPTMS nas proporções SPION/MPTMS 1:1 (SPION@MPTMS 1), 1:2 (SPION@MPTMS 2) e 1:3 (SPION@MPTMS 3), dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.



Fonte: Autoria própria

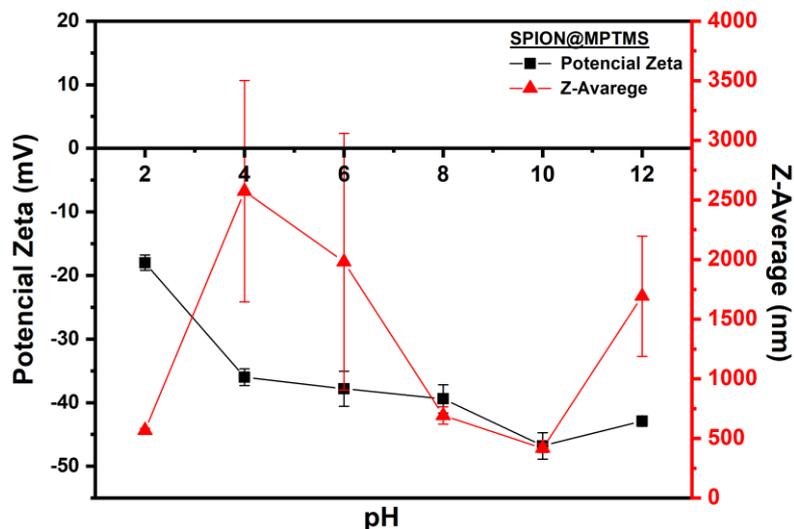
Os SPIONs recobertos com MPTMS desempenharam comportamento diferente dos valores de potencial zeta, quando comparado os SPIONs modificados com APTS, no item 4.3.1. O 3-(mercaptopropil)trimetóxisilano possui o $pK_a=10,47$, e em pH ácido ou neutro, o enxofre permanece protonado (-RSH). Após atingir o pK_a , em condições alcalinas, ocorre a desprotonação do tiol formando os ânions tiolatos (RS^-) de caráter nucleofílico, tornando-os suscetíveis à oxidação^{138,139}. Esse comportamento dos tióis-silanos acarreta valores negativos de potencial zeta, contribuindo para a estabilidade coloidal pelo efeito das forças de repulsão eletrostáticas. Esse comportamento difere dos amino-silanos ($pK_a=10,6$), na qual o grupo amino é protonado em condições ácidas e neutra até atingir seu pK_a (ponto isoelétrico), apresentado estabilidade apenas em condições básicas ($pH>10$).

De acordo com as medidas experimentais obtidas pelas análises de potencial zeta e mobilidade eletroforética, houve a melhora dos resultados ao diminuir a proporção SPION/MPTMS (m/m), assim como já observado para o estudo de concentração de APTS, discutido anteriormente. Quanto menor a proporção SPION/MPTMS, mais efetivo e uniforme ocorre o recobrimento em torno de partículas

individuais. Ao aumentar a concentração de silano, favorece a formação de policamadas e, conseqüentemente, a agregação das partículas em uma matriz polimérica, resultando em menos grupos tióis disponíveis para etapa posterior de funcionalização. Pallavicini (2015)⁸⁰ quantificou os grupos tióis disponíveis em seu estudo sobre a proporção SPION/MPTMS na modificação das nanopartículas magnéticas. Os resultados observados pelo autor corroboraram a análise de potencial zeta obtida nesse trabalho, onde para menores proporções, houve maior número de -SH livre por nanopartículas, demonstrando que para baixas concentrações favorecem a formação de monocamadas. Por outro lado, razões mais elevadas promovem a formação de policamadas, formando um invólucro polimérico.

O valor de potencial zeta e de mobilidade eletroforética dos SPIONs recobertos com MPTMS na proporção SPION/MPTMS 1:1 (m/m) (SPION@MPTMS 1), foram menores quando comparados com os valores das nanopartículas de magnetita antes do recobrimento (SPION). Observa-se que as partículas permanecem estáveis para a maioria dos pH (< -30 mV), exceto para pH igual a dois, na qual se encontra na faixa de estabilidade a curto prazo (~19 mV). Em pH fisiológico, os grupos tióis estão em sua forma aniônica (-RS⁻)¹³¹, acarretando em cargas negativas na superfície das nanopartículas, aumentando a repulsão eletrostática e melhorando a estabilidade coloidal. Observa-se que para as amostras de SPION e SPION@MPTMS, os valores de potencial zeta para essa região foi de ~ -31 mV e ~ -40mV, respectivamente. Para as amostras SPION@MPTMS 2 e 3, nota-se que os valores de potencial zeta estão próximo daqueles da amostra de SPION sem recobrimento, sugerindo que a modificação da superfície não foi efetiva. Na região de interesse para aplicação biológica, pH entre 6-8, a estabilidade coloidal das partículas diminuiu para as amostras recobertas com tiol-silano, pois a elevada concentração de organossilanos ocasionou a formação de grandes cadeias poliméricas, provocando a agregação das nanopartículas.

Figura 59 - Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico *versus* pH da amostra SPION@MPTMS 1.

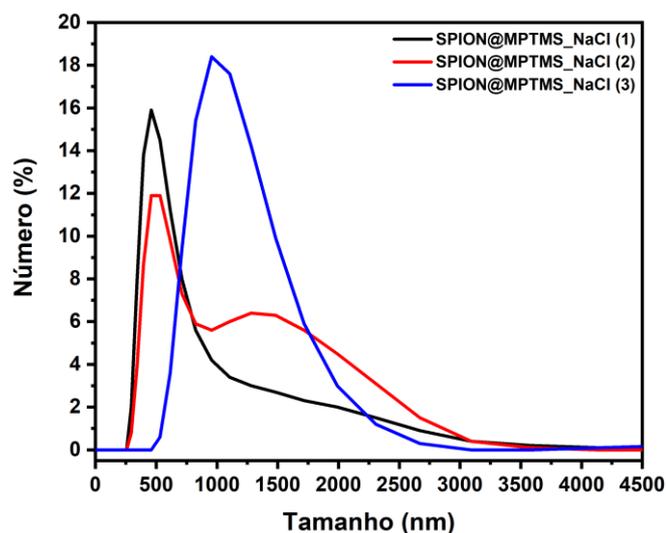


Fonte: Autoria própria

Na Figura 59, correlacionou-se os valores de potencial zeta e tamanho hidrodinâmico (Z-Average) para diferentes pH da amostra SPION@MPTMS 1. Embora os valores de potencial zeta indiquem que os SPIONs recobertos com tiol-silano são estáveis para $\text{pH} > 2$, ocorreu o aumento do tamanho hidrodinâmico para os pH 4, 6 e 12. O grupo tiol é receptor de elétrons, ou seja, possui caráter ácido. Em $\text{pH} = 2$ ocorre repulsão eletrostática entre o tiol-silano (R-SH) presente na superfície das nanopartículas e os íons H^+ em solução, ocasionando um menor valor de Z-Average. Na região de pH 4 e 6, na qual a concentração de H^+ em solução diminui, as forças de repulsão eletrostática deixam de atuar, e a presença do próton pode interferir na polarizabilidade da molécula do MPTMS, favorecendo novas interações entre os átomos de enxofre como, por exemplo, interações de van der Waals. Essas interações intermoleculares são fracas, não alterando a carga da partícula, na qual se observa uma constância nos valores de potencial zeta e com baixos valores de erro, entretanto nota-se o aumento do tamanho hidrodinâmico e um valor elevado valor do erro. Para pH 8-10, atingiu-se o valor do pKa, sendo a região de maior estabilidade coloidal e conseqüentemente menor tamanho hidrodinâmico. Para $\text{pH} > 10$, o grupo tiol é desprotonado prevalecendo a forma aniônica ($-\text{RS}^-$), de caráter nucleofílico, na qual pode ocorrer a oxidação e formação da ligação dissulfeto entre as partículas modificadas com o MPTMS, proporcionando o aumento do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, como é observado na Figura 59. A curva de distribuição de tamanho da amostra SPION@MPTMS 1 em função do número de partículas encontra-

se na Figura 60, na qual realizou-se três corridas consecutivas, para averiguar a confiabilidade das medidas.

Figura 60 - Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@MPTMS 1.



Fonte: Autoria própria

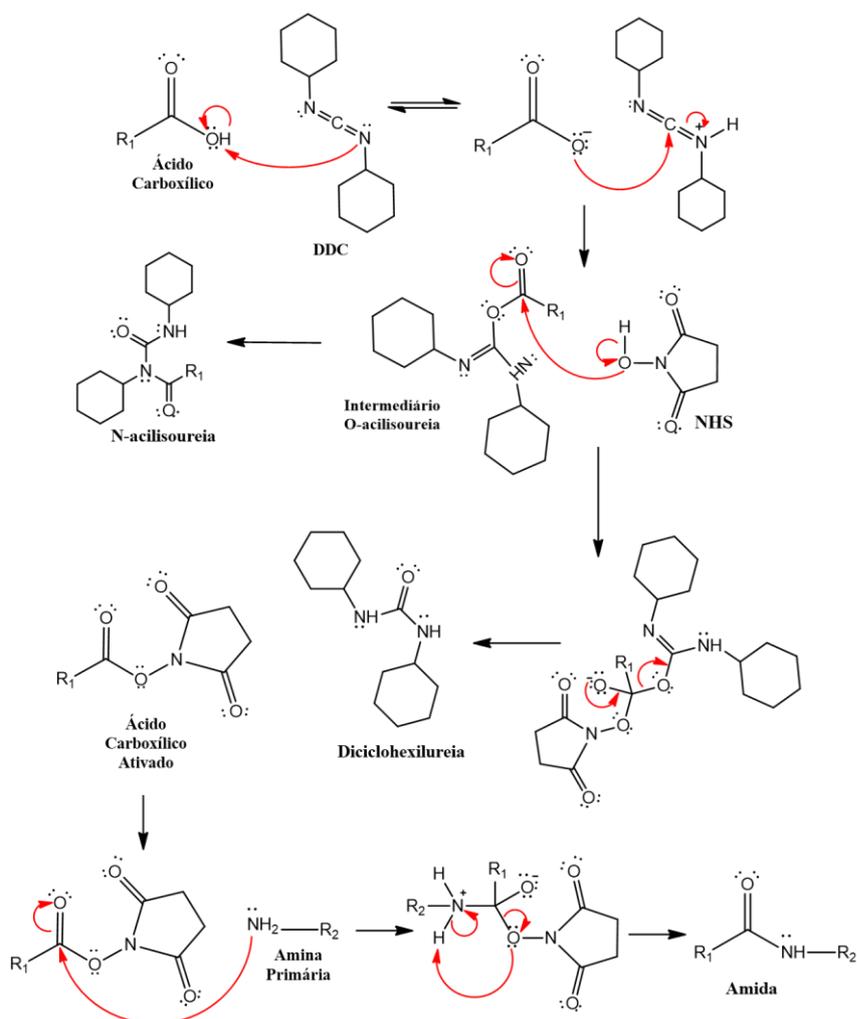
Nota-se na primeira corrida (linha preta) o início da agregação dos SPIONs recobertos com MPTMS. A maior porcentagem do número de partículas encontra-se distribuídos em uma estreita faixa de tamanho com um máximo em 458 nm. Surge uma nova distribuição a partir de aproximadamente 1000 nm, onde pequenas quantidades de partículas estão distribuídas em uma larga faixa de tamanho, indicando o princípio da formação de agregados. Esse processo é confirmado na segunda corrida (linha vermelha), na qual ocorreu a sobreposição da distribuição na região de 458 nm, porém, em menor quantidade, enquanto houve o aumento do número de partículas para maiores tamanhos, característico de uma curva bimodal. Na última corrida (linha azul), observa-se uma curva monomodal alargada e deslocada para maior tamanho de partículas (1264 nm), confirmando o processo de agregação da amostra SPION@MPTMS. Apesar da formação de agregados para essa amostra, o valor de polidispersividade foi de 0,486, indicando uma boa qualidade de resultado, representando uma amostra monodispersa. A alta concentração de partículas recobertas com tiol-silano pode ter influenciado na formação de agregados, pois faz com que aumente a frequência das colisões, e diminui o espaço na qual as nanopartículas possam se movimentar na solução. Para melhor obter a confiabilidade desses resultados, e para um posterior estudo simulando o fluido sanguíneo, será

necessário um estudo na concentração da amostra, na qual não foi possível realizar em circunstância da Pandemia.

4.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico

O ácido fólico é classificado como vitamina B, solúvel em água, tornando-o uma molécula de interesse para aplicação em meio biológico, como agente de direcionamento teranóstico^{13,140}.

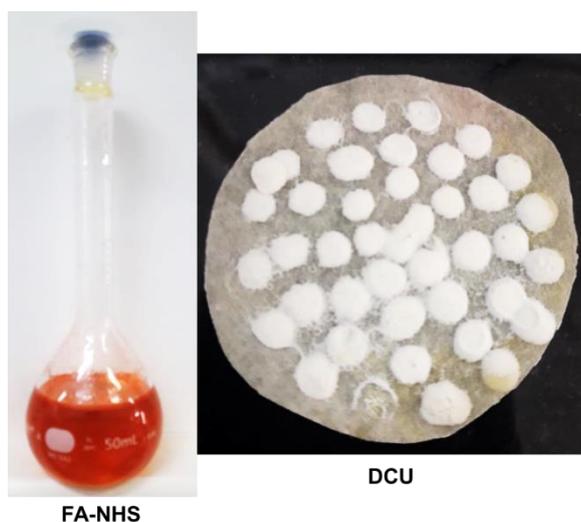
Figura 61 – Mecanismo de ativação do ácido fólico via DDC/NHS e posterior reação com amina primária para formação da ligação amida.



A estratégia utilizada nesse trabalho para a funcionalização direta do ácido fólico na superfície dos SPIONs recoberto com APTS e para a modificação do ácido fólico com amito-tiol para posteriormente acoplar na superfície dos SPIONs modificados com MPTMS, foi a ligação covalente entre o grupo carboxílico e o grupo amina via ligação amida, conhecido como método da carbodiimida, e o mecanismo

está representado na Figura 61. Nesse método, utiliza-se o *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DDC) como ativador do grupo carboxilato do ácido fólico, formando um intermediário (O-acilisourea), e o *N*-hidroxissuccinimida (NHS) como estabilizador do intermediário para a reação de reticulação com a amina ¹⁴¹. O subproduto formado após a ativação do ácido fólico via DDC/NHS é o diclohexiluréia (DCU), precipitado branco, que foi removido por múltiplas filtrações (Figura 62).

Figura 62 – Solução de ácido fólico ativado (FA-NHS) pelo método da carbodiimina e seu subproduto, diclohexiluréia (DCU), removido por filtração.

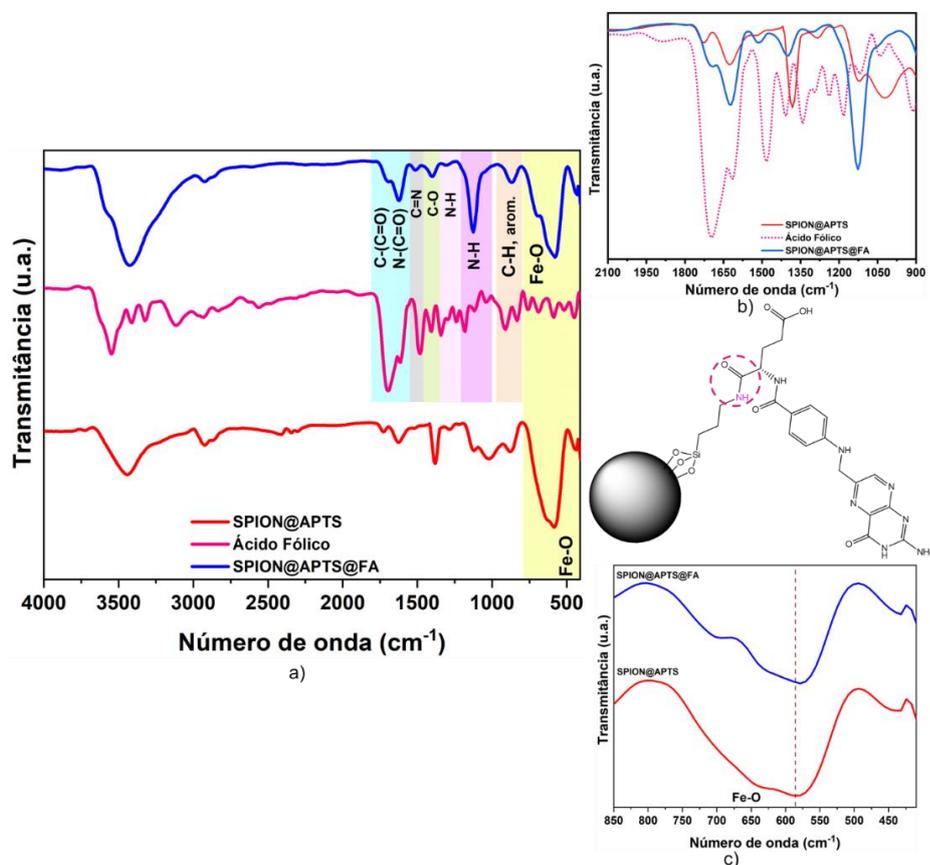


Fonte: Autoria própria

4.4.1. Funcionalização da superfície dos SPIONs recobertos com APTS (SPION@APTS@FA) via ligação amida

A biocompatibilização das nanopartículas foi realizada pelo acoplamento dos grupos carboxilatos do ácido fólico com os grupos amino-terminais do APTS. O acoplamento ocorre pela formação de uma ligação amida do tipo peptídica.

Figura 63 - Espectros FTIR a) amostras de nanopartículas antes do recobrimento (SPION), recobertas com APTS (SPION@APTS), e após a funcionalização com o ácido fólico (SPION@APTS@FA), b) recorte na região da ligação amida, c) recorte na região da ligação Fe-O. No detalhe, é mostrado a estrutura do SPION modificado com APTS e funcionalizado com o ácido fólico.



Fonte: Autoria própria

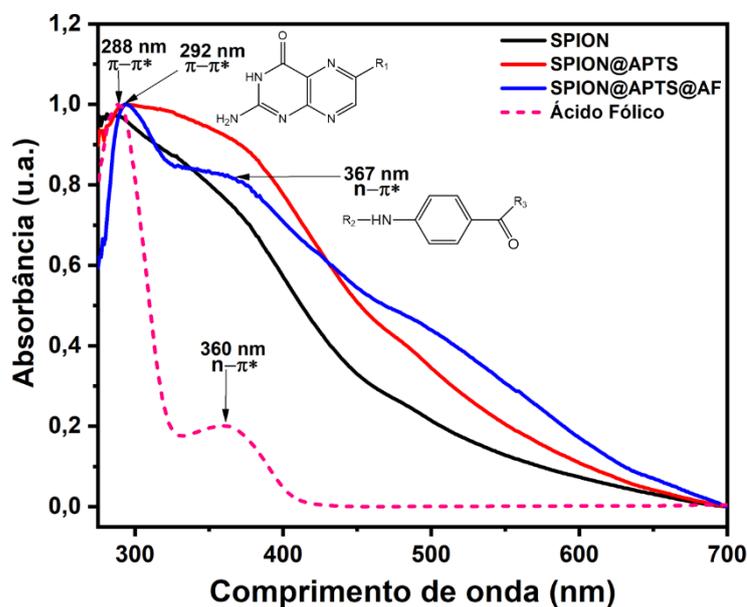
Tabela 13 - Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho das amostras de SPION@APTS e SPION@APTS@FA.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@APTS	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@APTS@FA
692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O	693-578/431	ν_1/ν_2 Fe-O
3482	ν O-H,sim/ ν O-H,assim/ ν N-H,assim	886	δ C-H, aromático dissubstituído
16534-1527	δ N-H,assim	1126	δ N-H
1127-1015-878	ν Si-O-Si / ν Si-O-H	1307	ν N-H, aromático
1235	ν Si-C	1400	ν C-O, carbonil
1384	δ C-N	1512	ν C=N
2934	ν C-H	1620	ν N-(C=O) (amida II)
		1690	ν C-(C=O) (amida I)
		2925-2868	ν C-H
		3426	ν O-H,sim/ ν O-H,assim/ ν N-H,assim

Fonte: Autoria própria

Na Figura 63a encontra-se o espectro no infravermelho das amostras de SPIONs recoberta com APTS e funcionalizada com ácido fólico (MNP@AT@AF). Nota-se que a banda referente à ligação Fe-O ainda permaneceu no espectro da amostra MNP@AT@AF, porém, menos intensa e levemente deslocada para menor número de onda quando comparada com a amostra SPION@APTS, de 588 cm^{-1} para 578 cm^{-1} (Figura 63c). Esse deslocamento é um indicativo do acoplamento do ácido fólico com o grupo amino-terminal do silano, uma vez que novas ligações covalentes podem ocasionar o deslocamento de componentes da interface¹²⁴. A ausência da banda Si-O de baixa intensidade no espectro da amostra funcionalizada evidencia também o acoplamento bem-sucedido do ácido fólico na amostra SPION@APTS, onde a mesma se encontra mascarada devido à sobreposição de bandas intensas do ligante funcional¹⁴². A banda de alta intensidade entre $3600\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída às vibrações da ligação N-H presente na porção pteridina (pt) da estrutura do ácido fólico ou possíveis grupos amino-livres do APTS¹³. Ainda nessa região, pode haver a sobreposição dos modos vibracionais de estiramento simétrico e assimétrico da ligação O-H ($\nu_{\text{O-H,sim}}$ e $\nu_{\text{O-H,assim}}$) da fração de ácido glutâmico da molécula de ácido fólico. A banda na região de $2925\text{-}2868\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao modo de estiramento das ligações C-H que já estavam presentes na amostra SPION@APTS. As bandas em 1690 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} podem ser distinguidas e atribuídas aos modos vibracionais de alongamento da ligação C-C=O dos grupos ácidos carboxílicos presentes na estrutura do ácido fólico e na formação da ligação amida I, e de flexão da ligação N-C=O atribuído a formação da ligação amida II, respectivamente^{11-13,113,142}. A menor intensidade e o deslocamento para maior número de onda do grupo carboxilato, como observado no recorte apresentado na Figura 65b, comprovam a formação da ligação amida I e amida II, indicando o que o ácido fólico foi acoplado com sucesso na superfície dos SPIONs modificado com APTS¹³. As bandas na região entre $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ são correlacionadas com os modos vibracionais do anel fenil da porção pteridina (pt) do ácido fólico^{12,142}. A banda presente em 1512 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de C=N¹¹⁶, e as bandas em 1400 e 1307 cm^{-1} , correspondem às vibrações de alongamento assimétrico e simétrico do grupo carbonil¹⁴⁰ e estiramento N-H do grupo amina¹⁴³, respectivamente. As bandas em 1126 e 886 cm^{-1} correspondem às vibrações dentro e fora do plano de NH₂¹⁴⁰ e ao modo vibracional C-H do anel benzênico^{143,144}.

Figura 64 – Espectroscopia na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas antes de recobrir (SPION), após o recobrimento com APTS (SPION@APTS), funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@AF) e do ácido fólico livre.



Fonte: Autoria própria

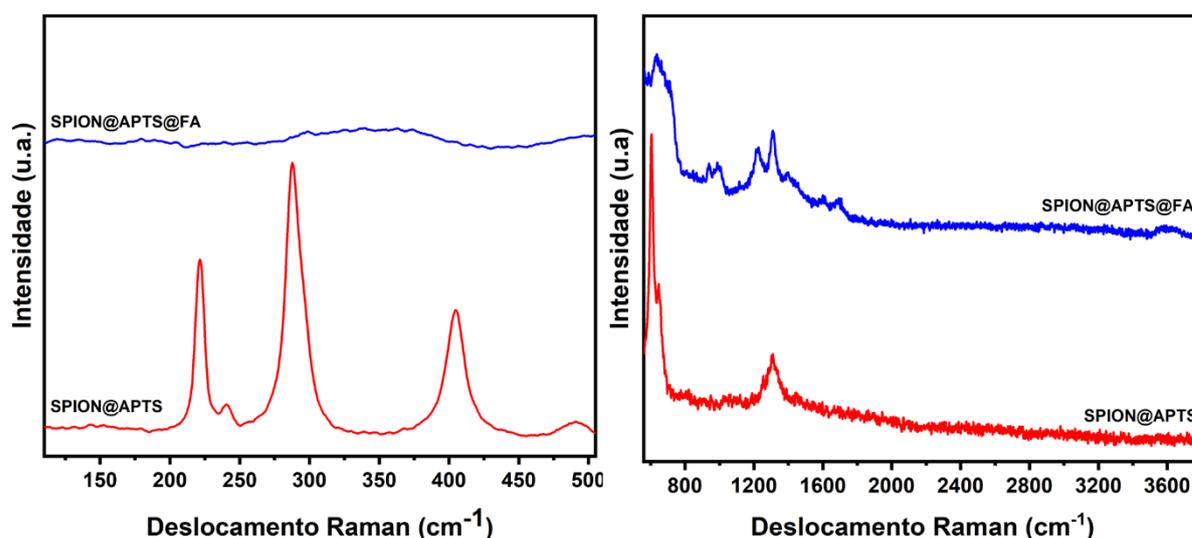
Os espectros de absorção na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas nuas (SPION), modificadas com amino-silano (SPION@APTS), funcionalizadas com ácido fólico (SPION@APTS@FA) e o ácido fólico livre estão presentes na Figura 64, e foram preparadas em solução de DMSO. O espectro de absorção da amostra de SPION (linha preta), demonstra que a magnetita possui um espectro indefinido, com bandas de absorção sobrepostas devido às transições eletrônicas que ocorre dentro da própria rede cristalina. Há três principais fatores que podem resultar nessas transições, sendo eles: 1) efeito do campo ligante do Fe(III); 2) interações entre os íons de Fe(III) magneticamente acoplados e 3) excitações de transferência de carga entre ligante-metal do óxido de ferro, a partir das bandas de valência do átomo de oxigênio (O-2p) para os orbitais do campo ligante do átomo de ferro (Fe-3d). Também, considerando a estrutura da magnetita sendo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ (Fe_3O_4), é possível ocorrer excitações de transferência de carga entre o doador de elétron (Fe^{II}) e o receptor de elétron (Fe^{III}). Essas transições eletrônicas ocasionadas pelo efeito do campo ligante do Fe(III) resultam em absorbância principalmente na região entre 290-380 nm, já as transições devido ao efeito de transferência de carga são responsáveis pela maior parte da absorção em todo espectro na região do visível¹⁴⁵. O espectro de absorção da amostra recoberta com APTS (linha vermelha), observa-se que não houve mudança no comportamento do espectro quando comparado com o da amostra de

SPIONs sem o recobrimento, indicando que a presença do silano na superfície das nanopartículas não alterou a estrutura do óxido de ferro. Observa-se um alargamento na absorção entre aproximadamente 280-400 nm, mesma região responsável pelas transições do efeito do campo ligante do Fe(III), como também um aumento da intensidade de absorção, devido aos efeitos de transferência de carga, em todo o espectro da amostra SPION@APTS, que pode ser justificado pela ligação covalente do amino-silano na superfície da estrutura cristalina do óxido de ferro (Fe-O-Si).

Para a amostra de nanopartículas recobertas com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA) nota-se o comportamento semelhante as transições eletrônicas atribuídas ao óxido de ferro, entretanto ao comparar com o espectro do ácido fólico livre, novas bandas deslocadas nas regiões entre 200-300 e 300-400 nm indicam o acoplamento do ácido fólico na superfície das nanopartículas^{116,146,147}. Houve o deslocamento da banda de absorção de 288 para 292 nm, atribuída a transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ da porção pteridina (pt) do ácido fólico, como também de 360 para 367 nm, característico da transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ da porção do ácido p-aminobenzóico (paba) da molécula de ácido fólico¹⁴³.

A análise de espectroscopia Raman da amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA) é mostrada na Figura 65 e na Tabela 14 as atribuições dos deslocamentos Raman das respectivas amostras

Figura 65 - Espectro Raman da amostra recoberta com APTS (SPION@APTS) e após a funcionalização com ácido fólico (SPION@APTS@FA) utilizando laser 785 nm e intensidade de 100%.



Fonte: Autoria própria

Tabela 14 - Deslocamentos Raman atribuídos para óxidos de ferro recobertos com APTS (SPION@APTS) e funcionalizados com ácido fólico (SPION@APTS@FA).

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION@APTS 100%	Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	SPION@APTS@FA 100%
221	Hematita	633	$\nu_s(\text{C=N}), \nu_{as}(\text{C=C})$ (paba) ^{136,148}
240	Hematita	938-986	$\rho(\text{CH}_2)$ (paba) ¹³⁶
287	Hematita	1226	$\nu(\text{C=O}) + \omega(\text{C-N})$ (amida III) (GA) ^{135,136,149}
404	Hematita	1311	$\omega(\text{CH}_2)$ (paba); $\nu(\text{C=O}) + \omega(\text{C-N})$ (amida III) (GA) ^{136,149}
492	Hematita	1394	$\nu(\text{C=N}, \text{C=C}, \text{C=O})$ (pt) ¹⁴⁸
604-645	Hematita	1600	$s(\text{NH}_2) + \nu_{as}(\text{C=N})$ (pt); $\nu_s(\text{C=C}) + \rho(\text{CH})$ (paba) ^{136,148}
1308	Hematita	1693	$\nu(\text{C=O}) + \omega(\text{C-N})$ (amida I) (GA); $\nu(\text{C=C})$ (paba) ^{135,149}

***v** = estiramento (alongamento); **p** = balanço; **w** = abano; **s** (tesoura)
paba = ácido p-aminobenzóico; **pt** (pteridina); **GA** = ácido glutâmico*

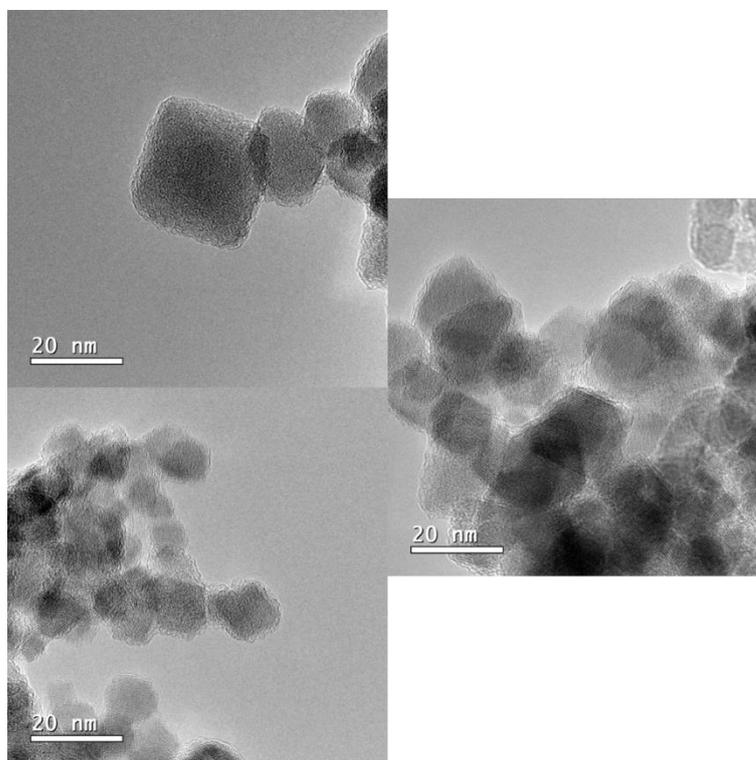
Fonte: Autoria própria

O espectro Raman está apresentado em duas regiões na Figura 65, de 100-510 cm⁻¹ e 560-3800 cm⁻¹. Observa-se que não houve conversão da magnetita em hematita para a mesma intensidade do laser. Como discutido anteriormente, a mudança de fase da magnetita para hematita, com a fase maghemita intermediária, foi menos efetivo após o recobrimento com APTS, e ao acoplar o ácido fólico na superfície das nanopartículas modificadas via ligação amida, não houve nenhuma mudança de estrutura do óxido de ferro, indicando que os processos de modificação e funcionalização melhoram a estabilidade dos SPIONs e protegeram de processos de oxidação¹⁰¹.

As principais bandas que comprovam o acoplamento do ácido fólico na superfície das nanopartículas de magnetita recoberta com APTS estão entre 560-3800 cm⁻¹. A banda em 1600 cm⁻¹ pode estar relacionada tanto ao alongamento da vibração N-H e C=N do anel pteridina (pt), como também com o modo de alongamento C=C do anel fenileno e à vibração de flexão assimétrica no plano (balanço) da ligação C-H do ácido p-aminobenzóico (paba)^{136,148}. Bandas Raman na região de 1693, 1311 e 1226 cm⁻¹ indicam que houve o acoplamento do ácido fólico na superfície dos SPIONs por meio da ligação amida. O alongamento C=O e a vibração de curvatura assimétrica fora do plano (abano) da ligação N-H são característicos da ligação amida I, na região do ácido glutâmico da molécula de ácido fólico (FA), e somado com o estiramento

C=C do ácido p-aminobenzóico, compõe a banda na região de 1693 cm^{-1} . Já as bandas 1311 e 1226 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C=O e à vibração de abano da ligação (C-N) atribuídos a ligação amida III^{135,136,149}. Em 1394 cm^{-1} está presente os estiramentos referentes as ligações C=N, C=C e C=O da pteridina (pt). As bandas Raman em $938-986\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à vibração de flexão assimétrica no plano da ligação CH₂ do ácido p-aminobenzóico¹³⁶. Os estiramentos, simétrico da ligação C=N da pteridina e assimétrico da ligação C=C do paba, são atribuídos à banda em e 633 cm^{-1} ^{136,148}.

Figura 66 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para amostra de SPION recoberta com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA).

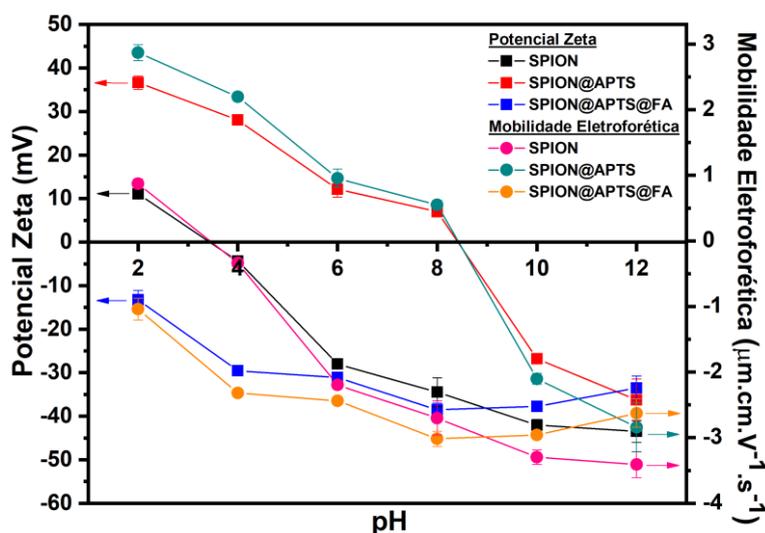


Fonte: Autoria própria

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra dos SPIONS recobertos com APTS e funcionalizados com ácido fólico (SPION@APTS@FA) encontra-se na Figura 66. Nota-se que não houve mudança dos SPIONS modificada com APTS após a funcionalização, permanecendo com uma estreita camada de silano sobre a superfície das partículas individualizadas. Não é possível afirmar pelas imagens que após acoplar o ácido fólico na superfície das nanopartículas melhorou a dispersão das partículas, uma vez que após a secagem do solvente elas propendem a se aglomerarem.

As medidas da variação dos valores de potencial zeta e da mobilidade eletroforética em função do pH, para estudo da modificação de superfície dos SPIONs com APTS (SPION@APTS 6) e funcionalização com ácido fólico (SPION@APTS@FA), estão presentes na Figura 67.

Figura 67 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION), recobertas com APTS e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.



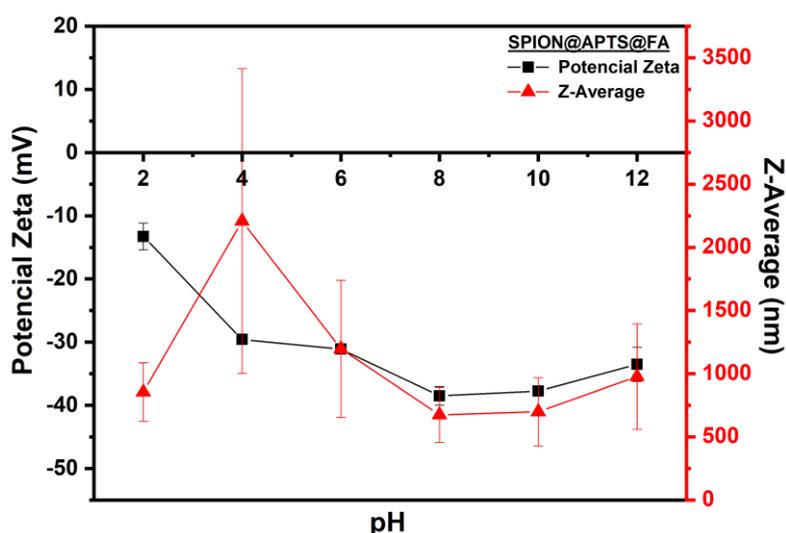
Fonte: Autoria própria

Observando os dados obtidos pela análise de potencial zeta das amostras funcionalizadas com ácido fólico e comparando com os valores das nanopartículas modificadas com APTS, é possível verificar diferentes comportamentos da superfície das partículas em função do pH, indicando a modificação da superfície dos SPIONs pela inserção da molécula orgânica do ácido fólico, os quais encontram-se de acordo com a literatura^{142,150,151}. Nota-se que mesmo com a presença de cargas positivas e negativas na interface dos SPIONs, houve decréscimo para apenas valores negativos de potencial zeta da amostra SPION@APTS após o acoplamento do ácido fólico (SPION@APTS@FA), melhorando a estabilidade coloidal das nanopartículas recobertas com APTS. Nesta faixa, o recobrimento apenas com APTS se situava na região de baixa estabilidade coloidal para condições próximas ao pH fisiológico, e o acoplamento com ácido fólico promoveu a mudança do potencial zeta de ~10 mV para ~35 mV após a funcionalização da superfície das partículas. O ácido fólico é uma molécula dipolar ou também conhecida como zwitteriônica, com duas constantes de dissociação ácida, sendo a primeira ($\text{pK}_a=2,3$) referente à porção do ácido glutâmico

e a segunda ($pK_a=8,5$) pertencente à porção pteridina do ácido fólico¹⁵², e o ponto isoelétrico é obtido pela média dos dois valores de pK_a ($P_{IE}=5,4$). Em condições ácidas ocorre a protonação da porção pteridina do ácido fólico, corroborando os dados de potencial zeta apresentado na Figura 67. Após alcançar a forma zwitteriônica da molécula do ácido fólico (ponto isoelétrico), ocorre a desprotonação do grupo carboxílico da porção do ácido glutâmico que não participa do acoplamento na superfície das nanopartículas via ligação amida, observando-se menores valores de potencial zeta

É possível correlacionar a carga da superfície e a estabilidade coloidal, com os tamanhos hidrodinâmicos, como observado na Figura 68. Apesar da baixa estabilidade coloidal para o pH 2, nota-se que o tamanho hidrodinâmico é pequeno. Para $pH < 3,5$ pode ocorrer a degradação da molécula de ácido fólico¹⁵², o que justificaria a baixa estabilidade e o pequeno tamanho. Em contrapartida, para pH 4,00 apesar da boa estabilidade coloidal (~ -30 mV), percebe-se o aumento do Z-Average, e devido à capacidade da molécula de ácido fólico em dispor de cargas positivas e negativas, novas interações intermoleculares podem estar ocorrendo, resultando no aumento do raio hidrodinâmico. Para pH de 6 a 12 verifica-se a correspondência entre os valores potencial zeta e Z-Average, onde quanto maior a estabilidade coloidal da amostra, menores são os tamanhos hidrodinâmicos.

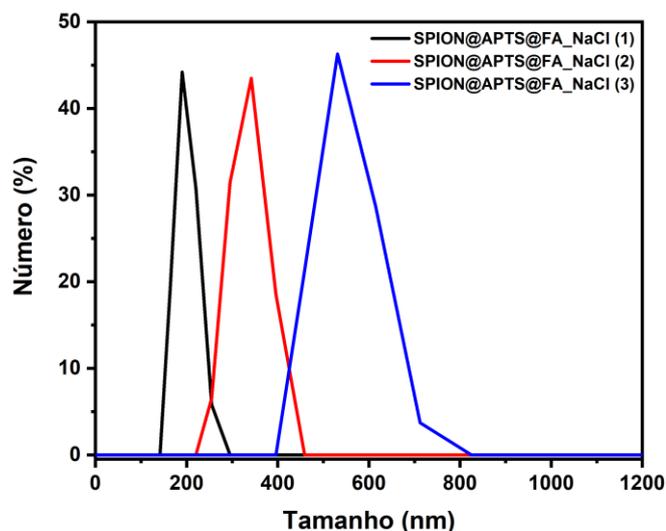
Figura 68 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico *versus* pH da amostra SPION@APTS@FA.



Fonte: Autoria própria

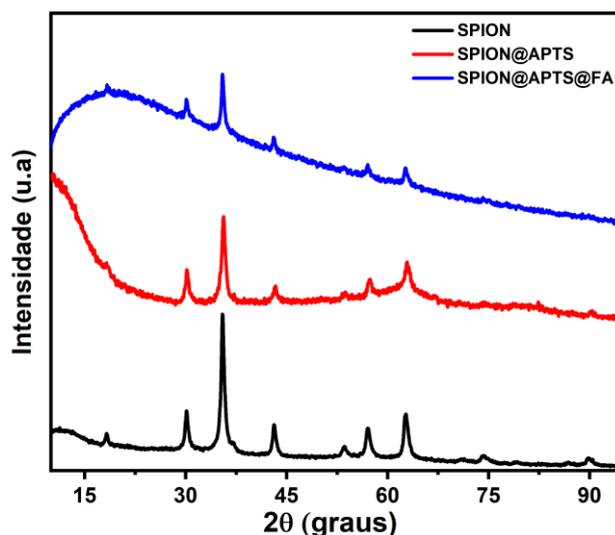
As curvas de distribuição de tamanho da amostra SPION@APTS@FA em função do número de partículas encontra-se na Figura 69.

Figura 69 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@APTS@FA.



Fonte: Autoria própria

Apesar da estabilidade coloidal da amostra SPION@APTS@FA, averiguada anteriormente na análise do potencial zeta em função do pH, as curvas de distribuição de tamanho da amostra SPION@APTS@FA não se sobrepõem. Observou-se o aumento do tamanho das partículas no decorrer das corridas, assim como o alargamento das curvas, demonstrando que houve agregação das partículas. A alta concentração da amostra pode ter favorecido o processo de agregação, contudo não foi possível realizar o estudo para o ajuste da concentração por conta do tempo reduzido pela Pandemia. Após adequar as condições, será realizada as medidas em solução simulando o fluido sanguíneo, como parâmetro de comparação para futura aplicações *in vitro*. A partir do melhor resultado obtido para síntese de recobrimento com APTS na superfície das nanopartículas de magnetita utilizando o pH 11 e proporção APTS/SPIONs (m/m) 1:2 (SPION@APTS 6) e posteriormente o acoplamento do ácido fólico via ligação amida, realizou-se a análise por DRX (Figura 70) para avaliar se a modificação e funcionalização da superfície por ligações covalentes a partir da condensação do silano alterou a estrutura cristalina do óxido de ferro.

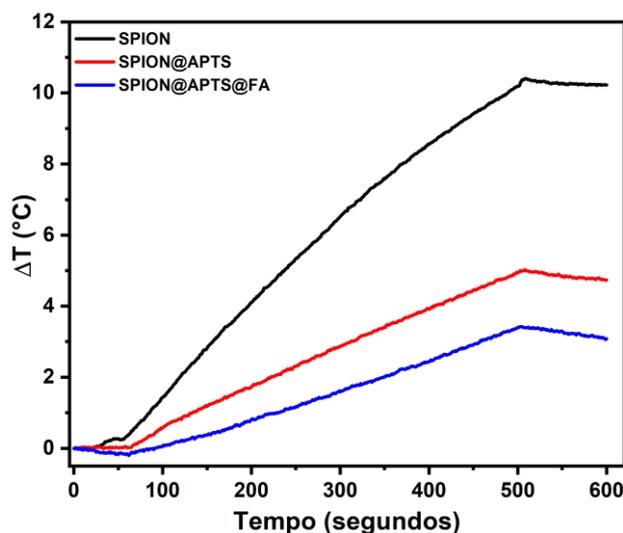
Figura 70 – DRX das amostras SPION, SPION@APTS e SPION@APTS@FA.

Fonte: Autoria própria

Pode-se observar que não houve modificação na estrutura cristalina espineló invertida da magnetita para as amostras recobertas SPION@APTS 6 (linha vermelha) e funcionalizada com ácido fólico SPION@APTS@FA (linha azul) em média e longa distância no retículo cristalino, quando comparadas com a análise realizada para as nanopartículas de SPIONs antes da modificação (linha preta). Mesmo com a presença do silano e do ácido fólico na superfície, nota-se os principais picos próximos do padrão de Fe_3O_4 cristalino discutidos anteriormente. A intensidade do pico diminuiu com a adição do APTS na superfície, e decresceu ainda mais com a adição do ácido fólico, o que significa que a presença do revestimento e posteriormente a inserção da molécula orgânico, podem cobrir o cristalito e reduzir a intensidade dos picos de DRX¹³³.

Os resultados de hipertermia magnética das amostras SPION, SPION@APTS e SPION@APTS@FA, estão presentes na Figura 71. Todas as amostras foram preparadas em meio aquoso, com a concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, e o ensaio de hipertermia foi realizado com baixos valores de frequência e amplitude (109,8 kHz, 24 mT).

Figura 71 – Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação do campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) das amostras sem recobrimento (SPION), recoberta com APTS (SPION@APTS) e funcionalizada com ácido fólico (SPION@APTS@FA).



Fonte: Autoria própria

Nota-se que a taxa de aquecimento dos SPION diminuiu ao recobrir a superfície das partículas com APTS (SPION@APTS) e funcionalizar com ácido fólico (SPION@APTS@FA), de $1,37^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para $0,67$ e $0,47^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Isso deve-se ao fato de que o relaxamento Browniano, um dos responsáveis pela elevação da temperatura após aplicação do campo, causado pelo atrito decorrente da rotação da própria partícula no líquido transportador⁹, diminuiu com a camada polimérica formada em volta das partículas após o recobrimento e o acoplamento de uma molécula orgânica com impedimento estérico, influencia na barreira de energia necessária para a rotação das partículas dentro de um fluido⁵. A presença do APTS e do ácido fólico na superfície das nanopartículas aumentam o volume hidrodinâmico⁹, na qual a presença de grupos funcionais com nitrogênio e oxigênio permitem novas interações intermoleculares, aumentando a camada de solvatação.

Pode-se observar esse comportamento ao efetuar os cálculos de SLP de todas as amostras utilizando a Equação 7, com o valor com valor de ρ_i calculado para a massa do metal na suspensão de SPIONs igual a $3,62 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$, e a massa da nanopartícula para as amostras SPION@APTS e SPION@APTS@FA ($5,00 \text{ mg}_{\text{MNP}}/\text{mL}$). Não foi possível determinar a massa do metal para as amostras recobertas com APTS e funcionalizada com ácido fólico, uma vez que as medidas de termogravimetria não foram concluídas por conta da Pandemia, portando os cálculos foram realizados com a massa das nanopartículas, ocasionando incertezas nos

valores obtidos. O valor de ILP foi obtido pela Equação 8 e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para as amostras SPION, SPION@APTS e SPION@APTS@FA

Amostra	Concentração		S _m	SLP (W/g)	H (KA/m)	f (kHz)	ILP (nHm ² /Kg)
	mg _{Fe} /mL	mg _{MNP} /mL					
SPION	3,62		0,03124	36,1072	19,1	109,8	0,90
SPION@APTS		5	0,05688	22,4932	19,1	109,8	0,58
SPION@APTS@FA		5	6,5x10 ⁻⁵	0,05445	19,1	109,8	1,36x10 ⁻³

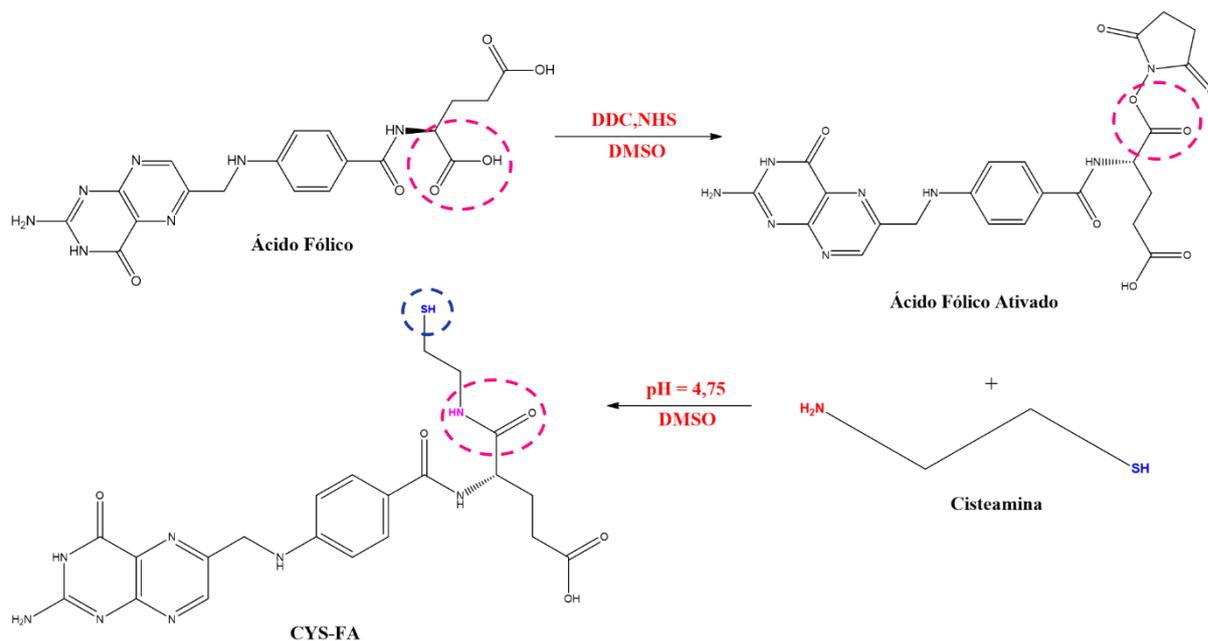
Fonte: Autoria própria

Apesar do decréscimo da temperatura das nanopartículas recoberta com silano e funcionalizada com ácido fólico, nota-se na Figura 71 que foi possível atingir uma elevação de 5 e 3,5°C respectivamente, em menos de 10 minutos, sendo um aumento de temperatura aceitável para que células tumorais atinjam a temperatura de apoptose (elevar a temperatura corporal de 37°C para que a apoptose ocorra entre 40-45°C)^{76,114}.

4.4.2. Conjugado cisteamina-ácido fólico (CYS-FA) via ligação amida

Para funcionalizar os SPIONs recobertos com MPTMS, foi fundamental a modificação do ácido fólico com amino-tiol, via ligação amida, para posteriormente acoplar na superfície dos SPION@MPTMS. O amino-tiol selecionado para esse trabalho foi o 2-aminoetanotiol, também conhecido como cisteamina. É uma molécula simples e de cadeia curta, atuando como ligante não tóxico, e pode ser utilizada como medicamento para tratamento de distúrbios neurológicos letais. A cisteamina também atua como precursora de vários componentes vitais do sistema metabólico, como para síntese da Coenzima A. Além disso, seu produto de clivagem pode ser útil para o combate de doenças como cistinose e cistinúria⁸¹. Devido a sua bifuncionalidade, pode ligar-se ao ácido fólico por ligação peptídica e na superfície das nanopartículas recobertas com tiol-silano, via ligação dissulfeto. O mecanismo geral da reação do ácido fólico com a cisteamina, adaptada do trabalho de Vortherms *et al.* (2008)⁸², Alupej *et al.* (2017)⁸³ e Khademi *et al.* (2018)⁸⁴, para formação do produto CYS-FA, um pó fino de cor amarelo escuro, está presente na Figura 72

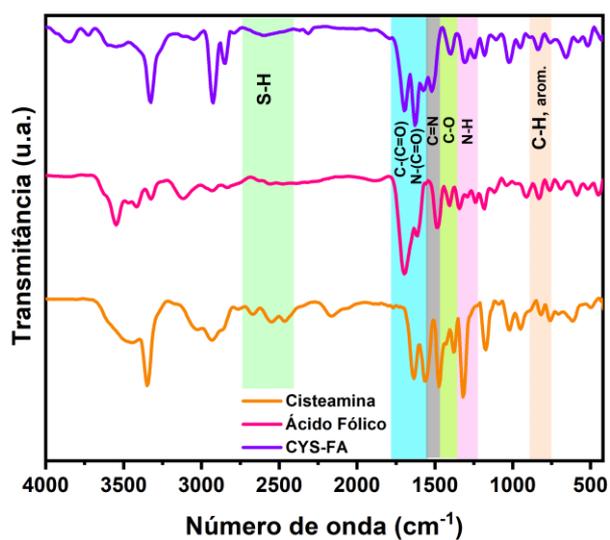
Figura 72 – Mecanismo geral da reação para o acoplamento ácido fólico e cisteamina (CYS-FA)



Fonte: Autoria própria

Para confirma o acoplamento do ácido fólico com a cisteamina via ligação peptídica (CYS-FA), se utilizou a técnica FTIR, afim de identificar as bandas características da formação da ligação amida. Os espectros estão apresentados na Figura 73 e suas respectivas atribuições dos modos vibracionais estão na Tabela 16.

Figura 73 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos precursores ácido fólico e cisteamina, e da amostra CYS-FA



Fonte: Autoria própria

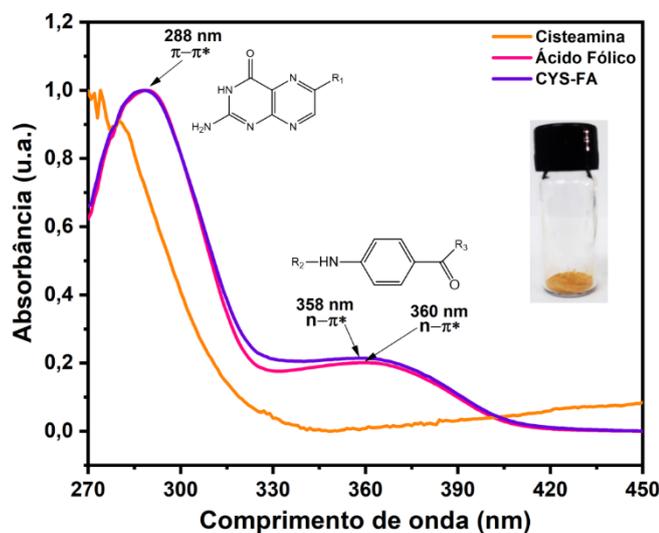
Tabela 16 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho da amostra CYS-FA.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração
	CYS-FA
3682	$\nu_{\text{O-H,sim}} / \nu_{\text{O-H,assim}} / \nu_{\text{N-H,assim}}$
2925-2849	$\nu_{\text{C-H}}$
2597	$\nu_{\text{S-H}}$
1697	$\nu_{\text{C-(C=O)}} \text{ (amida I)}$
1627	$\nu_{\text{N-(C=O)}} \text{ (amida II)}$
1520	$\nu_{\text{C=N}}$
1400	$\nu_{\text{C-O, carbonil}}$
1312	$\nu_{\text{N-H}}$
1023-947	$\delta_{\text{N-H}}$
837-756	$\delta_{\text{C-H, aromático dissustituído}}$

Fonte: Autoria própria

A conjugação do ácido fólico com a cisteamina foi verificada pela comparação dos respectivos espectros FTIR com o da amostra CYS-FA. A banda de absorção na região de 3682 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação hidroxila (O-H) presente na fração de ácido glutâmico e do estiramento assimétrico da ligação N-H do anel de pteridina¹¹⁶. O sinal assimétrico cerca de 1697cm⁻¹ é proveniente do alongamento da ligação C-(C=O), enquanto a banda em torno de 1627 cm⁻¹ corresponde ao estiramento da ligação N-(C=O), atribuídos à formação da ligação amida I e amida II^{11,13,113,116,142}. Com isso é possível confirmar que houve acoplamento entre as moléculas de ácido fólico e cisteamina. Outra banda importante que comprova a formação do produto de interesse nessa etapa, encontra-se na região 2597 cm⁻¹ e é proveniente do alongamento da ligação tiol (S-H)^{131,133,134}, grupo na qual irá se ligar na superfície dos SPIONs modificados com MPTMS via ligação dissulfeto. Bandas na faixa de frequência entre 1520-1300 cm⁻¹ são correlacionadas com absorções vibracionais de grupos fenil da pteridina¹¹⁶. As bandas nas regiões entre 1023-947 e 837-756 cm⁻¹ conferem com as vibrações de deformação das ligações N-H e C-H dos carbonos aromáticos, respectivamente^{143,144}.

Figura 74 - Espectroscopia na região do UV-Vis dos precursores cisteamina e ácido fólico, e da amostra CYS-FA



Fonte: Autoria própria

Na Figura 74 é possível observar os espectros de absorção na região do UV-Vis para as amostras de cisteamina livre (linha laranja), ácido fólico livre (linha rosa) e do produto CYS-FA (linha roxa). Como esperado, a cisteamina não possui banda de absorção na região do visível, pois não há transições de elétrons em sua estrutura. Ao comparar o ácido fólico livre com o produto CYS-FA, nota-se que não houve mudança na posição da banda na região de 288 nm, atribuída à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ da porção pteridina (pt) do ácido fólico. Também foi observado um leve deslocamento para menor comprimento de onda, de 360 para 358 nm, típico da transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ da porção do ácido p-aminobenzóico (paba) da molécula de ácido fólico¹⁴³, que pode ser atribuído à mudança de ligação no grupo carboxilato, devido ao acoplamento do ácido carboxílico com o grupo amina, para formação da ligação amida.

4.4.3. Funcionalização da superfície dos SPIONs recobertos com MPTMS (SPION@MPTMS@CYS-FA) via ligação dissulfeto

A biocompatibilização da superfície dos SPIONs recobertos com MPTMS foi realizada via ligação dissulfeto pela molécula de ácido fólico modificada com a cisteamina (discutida no item 4.4.2). Os grupos tióis são facilmente oxidados na presença do ar atmosférico, resultando em uma ligação covalente simples entre eles (R-S-S-R'). A metodologia utilizada nessa etapa é simples e rápida e utilizando apenas

solução tampão fosfato em pouco tempo foi possível observar a formação de bolhas na solução e vapor em volta do balão, como apresentado na Figura 75.

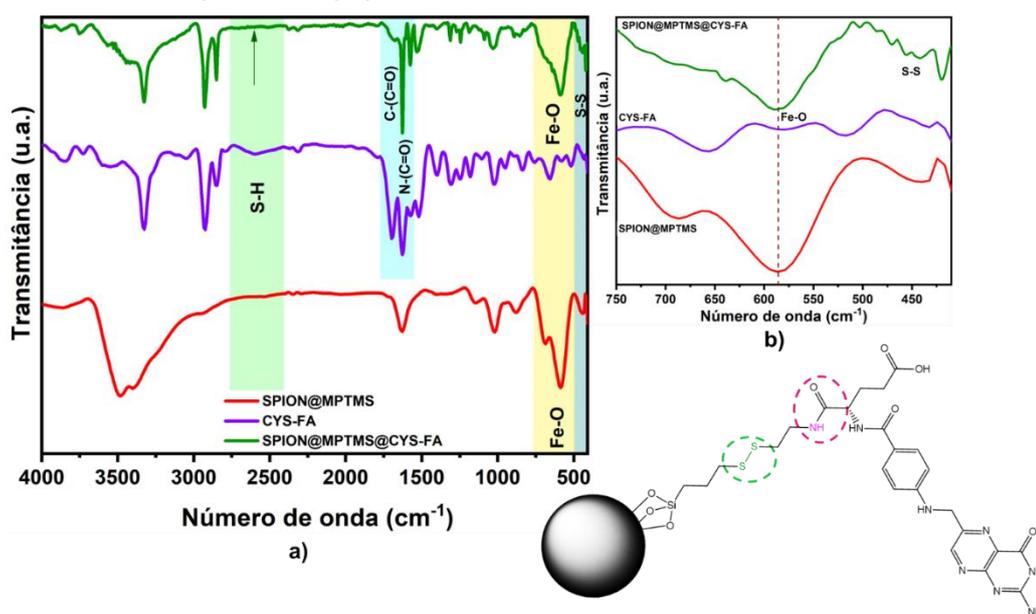
Figura 75 – Balão de síntese da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA



Fonte: Autoria própria

A espectroscopia na região do infravermelho da amostra recoberta com MPTMS (SPION@MPTMS), funcionalizada com ácido fólico modificado (SPION@MPTMS@CYS-FA) e da molécula de CYS-FA livre estão presentes na Figura 76 e suas respectivas atribuições dos modos vibracionais na Tabela 17.

Figura 76 – Espectros de absorção na região do infravermelho a) amostras de nanopartículas antes do recobrimento (SPION), após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTMS), e após a funcionalização com o ácido fólico modificado com a cisteamina (SPION@MPTMS@CYS-FA), b) Recorte na região das ligações Fe-O e S-S.



Fonte: Autoria própria

Tabela 17 – Modos vibracionais atribuídos na região no infravermelho da amostra SPION@APTS@FA.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@MPTMS	Número de onda (cm ⁻¹)	Modo de vibração SPION@MPTMS@CYS-FA
692-588/431	ν_1/ν_2 Fe-O	503, 455-442	ν_{s-s}
3484	$\nu_{O-H,sim}/ \nu_{O-H,assim}/$	696-590	ν_1/ν_2 Fe-O
1629	δ_{O-H}	891-855	δ_{C-H} , aromático dissubstituído
1161-1056-880	$\nu_{Si-O-Si} / \nu_{Si-O-H}$	1031	δ_{N-H}
2539	ν_{S-H}	1187	ν_{C-C-O}
689	δ_{C-S}	1312-1244	ν_{N-H}
2935	ν_{C-H}	1400	ν_{C-O} , carboníla
		1531	$\nu_{C=N}$
		1578	$\nu_{N-(C=O)}$ (amida II)
		1675	$\nu_{C-(C=O)}$ (amida I)
		2928-2851	ν_{C-H}
		3675-3000	$\nu_{O-H,sim}/ \nu_{O-H,assim}/$ $\nu_{N-H,assim}/ C-H, arom$

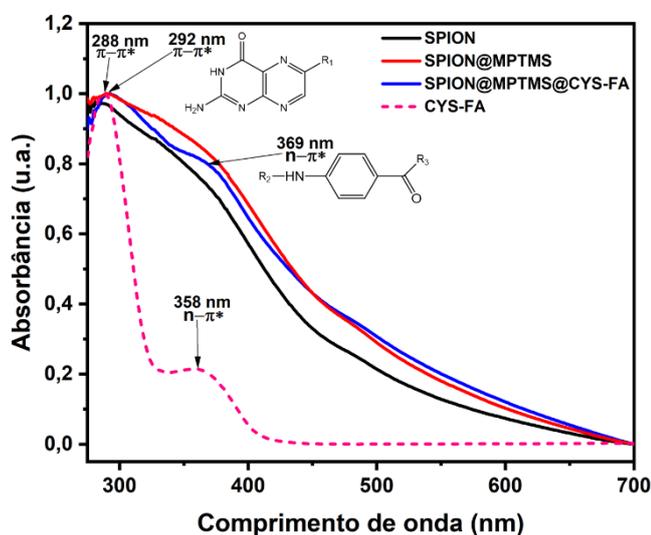
Fonte: Autoria própria

Na Figura 76a encontra-se o espectro da amostra de SPION recoberta com MPTMS e funcionalizada com ácido fólico modificado (linha verde), na qual é possível observar a banda referente a ligação Fe-O proveniente da estrutura da magnetita, porém, com menor intensidade e deslocada para maior número de onda quando comparada com a amostra SPION@MPTMS, de 588 para 590 cm⁻¹ (Figura 76b). Como já mencionado, esse deslocamento é decorrente do acoplamento do ácido fólico modificado com o grupo tiol-silano, uma vez que novas ligações covalentes na superfície das nanopartículas podem ocasionar o deslocamento de componentes da interfase¹²⁴. A confirmação da funcionalização com ácido fólico da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA ocorre na mesma região que a vibração de estiramento da ligação do óxido de ferro (ν_2 Fe-O), com o aparecimento das bandas 503, 455-442 cm⁻¹, que pertencem a vibração do alongamento da ligação S-S¹⁵³⁻¹⁵⁶, comprovando a ligação dissulfeto formada pelo acoplamento do MPTMS presente na superfície das nanopartículas de magnetita e o ácido fólico modificado com cisteamina, uma vez que não se observa essas bandas para amostra SPION@MPTMS e CYS-FA. O desaparecimento da banda na região em aproximadamente 2550 cm⁻¹ da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA, referente a ligação tiol (S-H), corrobora os dados que indicam a formação da ligação dissulfeto. A permanência das bandas específicas da

ligação amida I e amida II^{11,13,113,116,142}, respectivamente em 1675 e 1578 cm^{-1} , e outras bandas entre 1500-800, particulares dos grupos pteridina e ácido glutâmico da molécula^{116,143} de ácido fólico, provam a funcionalização dos SPIONs com ácido fólico.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis para as amostras de nanopartículas antes do recobrimento (SPION), após recobrir com MPTMS (SPION@MPTMS), funcionalizadas com o ácido fólico modificado (SPION@MPTMS@CYS-FA) e para molécula de CYS-FA livre, estão presentes na Figura 77.

Figura 77 - Espectroscopia na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas antes de recobrir (SPION), após o recobrimento com MPTMS (SPION@MPTMS), funcionalizada com ácido fólico modificado com cisteamina (SPION@MPTMS@CYS-AF) e do ácido fólico livre.

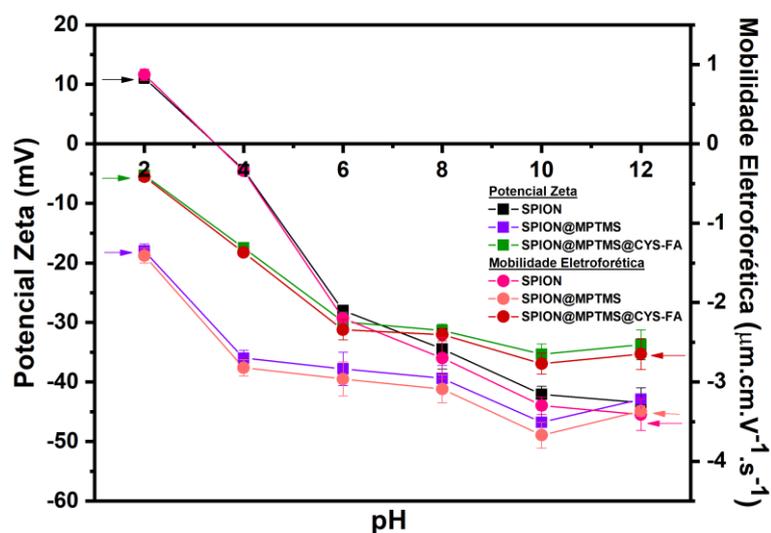


O espectro de absorção dos SPIONs nus (linha preta) e após o recobrimento com MPTMS (linha vermelha), apresentados na Figura 77, demonstraram comportamento indefinido, em razão da sobreposição das transições eletrônicas que ocorrem dentro da própria rede cristalina da magnetita¹⁴⁵, como justificado no item 4.1.1., assim como os efeitos de campo ligante e os efeitos de transferência de carga pela ligação covalente do silano na superfície das nanopartículas (Fe-O-Si), sem alterar a estrutura do óxido de ferro. Para a amostra SPION@MPTMS@CYS-FA (linha azul), nota-se o comportamento semelhante da amostra de magnetita recoberta com MPTMS e o aparecimento de bandas em regiões próximas ao da amostra CYS-FA livre (linha pontilhada rosa). Os deslocamentos para maiores comprimentos de onda, de 288 para 292 nm e de 258 para 269 nm, atribuídos às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ da porção pteridina (pt) e $n \rightarrow \pi^*$ da porção do ácido p-aminobenzóico (paba) da

molécula de ácido fólico¹⁴³, respectivamente, indicam que houve o acoplamento via ligação dissulfeto do ácido fólico modificado na superfície das nanopartículas de magnetita recobertas com MPTMS. Em razão da qualidade do espectro Raman obtido para a amostra SPION@MPTMS@CYS-FA, na qual não foi possível extrair dados consistentes para o objetivo desse trabalho, será necessário repetir a análise. Devido à problemas técnicos, o microscópio de transmissão do Instituto de Química de São Carlos ficou inoperante e, portanto, não foi possível obter imagens da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.

As medidas da variação dos valores de potencial zeta e da mobilidade eletroforética em função do pH, para estudo dos SPIONs referentes à modificação de superfície com MPTS (SPION@MPTMS 1) e funcionalização com ácido fólico modificado (SPION@MPTMS@CYS-FA), estão presentes na Figura 78.

Figura 78 – Potencial zeta e mobilidade eletroforética em função do pH para a amostra sem recobrimento (SPION), recobertas com MPTMS e funcionalizada com ácido fólico modificado com cisteamina (SPION@MPTMS@CYS-FA), dispersa em meio aquoso na presença do eletrólito cloreto de sódio na faixa de pH de 2 a 12.

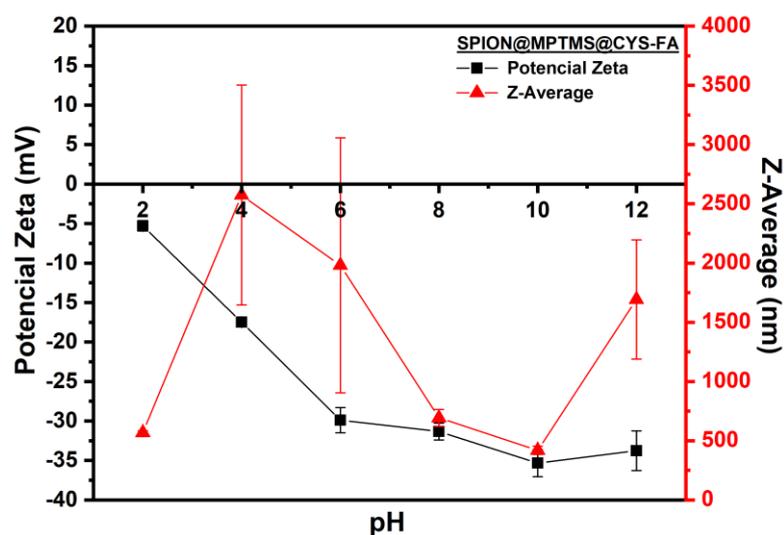


Fonte: Autoria própria

Os dados obtidos pela análise de potencial zeta para a amostra SPION@MPTMS@CYS-FA quando comparados com os valores da amostra SPION@MPTMS, demonstraram comportamentos distintos relacionados à modificação das propriedades da superfície das nanopartículas, confirmando a modificação dos SPIONs recobertos com MPTMS pela molécula CYS-FA via ligação dissulfeto. Apesar da mudança no comportamento das partículas funcionalizadas, os valores de potencial zeta permaneceram negativos. O aumento dos potenciais em função do pH

para amostra SPION@MPTMS@CYS-FA ocorreu devido à capacidade da molécula comportar carga positiva e negativa. Para região de interesse em aplicação biológica, pH entre 6-8, nota-se que as partículas permaneceram estáveis mesmo após a funcionalização. A correlação entre os valores de potencial zeta e Z-Average em função do pH, obtida pelas análises de potencial é, estão apresentadas na Figura 79.

Figura 79 – Gráfico do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico *versus* pH da amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.

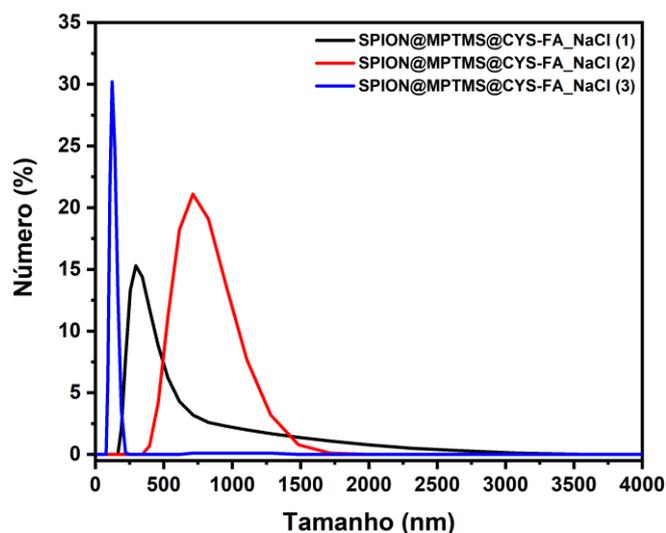


Fonte: Autoria própria

Nota-se que em pH=2, apesar da instabilidade medida pelo potencial zeta as partículas apresentaram pequeno valor de Z-Average. Para pH<3,5 as moléculas de ácido fólico podem ser degradadas¹⁵², justificando o baixo valor do tamanho hidrodinâmico. Na região onde ocorre a protonação da porção pteridina da molécula de ácido fólico, observa-se maiores valores de Z-Average, onde para pH=4 a estabilidade a curto prazo potencializa o processo de agregação das partículas, e em pH=6 interações intermoleculares torna-se capaz o aumento do volume hidrodinâmico das partículas, mesmo apresentando estabilidade pela carga da superfície. A instabilidade nessa região é constatada pelo grande valor do erro. Em pH 8-10, os tamanhos são condizentes com a carga de superfície. Entretanto para pH=12, apesar do potencial zeta demonstra a estabilidade coloidal das partículas, ocorreu o aumento no valor de Z-Average. A desprotonação dos grupos funcionais presentes na porção do ácido glutâmico pode ter favorecido novas interações intermoleculares que não

alteram a estabilidade, porém, refletem no valor do tamanho hidrodinâmico do material.

Figura 80 – Curva de distribuição de tamanho em função do número de partículas para a amostra SPION@MPTMS@CYS-FA.



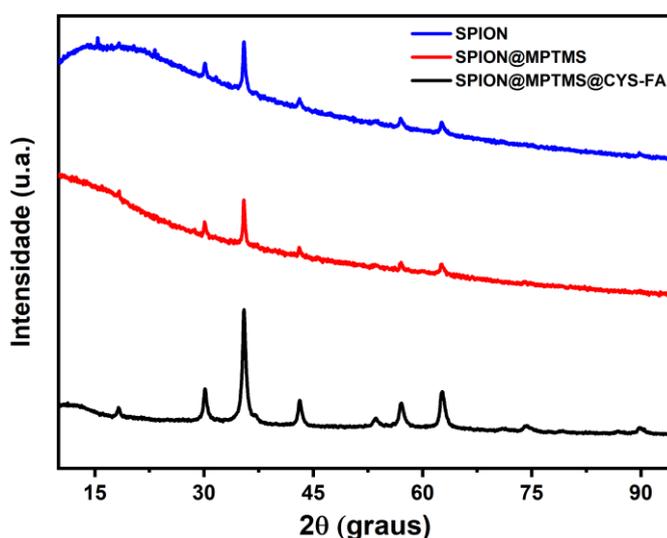
Fonte: Autoria própria

As curvas de distribuição do tamanho pelo número de partículas para amostra SPION@MPTMS@CYS-FA, estão representadas na Figura 80. Nota-se pelo perfil das corridas que primeiramente ocorreu a agregação das partículas e seguida de uma floculação. A primeira corrida (linha preta), observa-se o início da agregação, onde a maior porcentagem de partículas encontra-se distribuída em uma faixa estreita de tamanho com o pico em 295 nm, e essa distribuição de tamanho começa alargar para maiores tamanho de partículas a partir de aproximadamente 700 nm, indicando o processo de agregação. Na segunda corrida (linha vermelha), as partículas agregaram e a curva apresenta uma larga distribuição para tamanhos maiores de partículas. Por fim, a terceira corrida apresentou uma distribuição de tamanho afunilada para tamanhos menores do que a primeira corrida, demonstrando a floculação das partículas e o sinal obtido foi da movimentação das partículas que permaneceram em solução e não decantaram. Nota-se que para aplicação desses materiais em sistemas biológicos, será necessário realizar estudo de concentração para todas as amostras desse trabalho, e posteriormente a análise com solução que simula o fluido sanguíneo (SBF, do inglês *simulated body fluid*). A grande quantidade de partículas em solução está interferindo na dispersão e mobilidade das nanopartículas, favorecendo a agregação ou floculação, até mesmo para as amostras que apresentaram estabilidade coloidal pelas medidas de mobilidade eletroforética.

Contudo, a Pandemia afetou o tempo do trabalho e não foi possível realizar esse estudo até o momento.

As análises de difratometria de Raios X da amostra de SPION recoberta com MPTMS (SPION@MPTMS) e funcionalizadas com o ácido fólico modificado (SPION@MPTMS@CYS-FA) estão presentes na Figura 81, na qual é comparado com a análise de DRX para SPIONs nuas, afim de avaliar se houve alteração na estrutura cristalina da magnetita após os processos de modificação com silano e o acoplamento de ácido na superfície das partículas.

Figura 81 – DRX das amostras SPION, SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA.

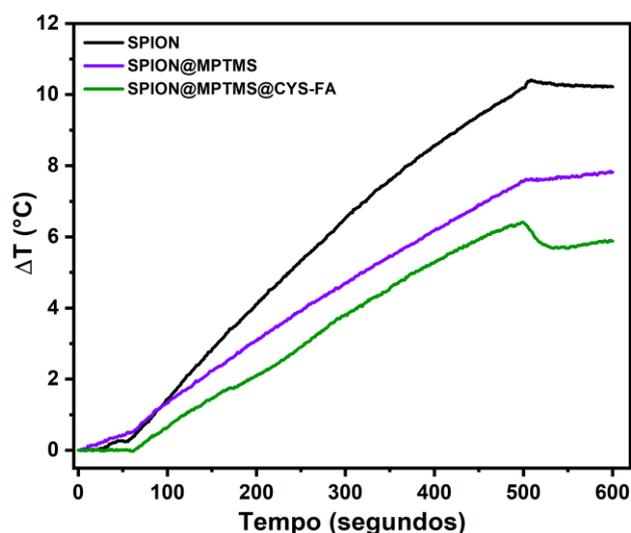


Fonte: Autoria própria

O processo de recobrimento e funcionalização não alteraram as posições dos picos característicos da estrutura cristalina espinélio invertida das nanopartículas de magnetitas, sugerindo que a modificação ocorre apenas por ligações covalentes na superfície do óxido de ferro (Fe-O-Si), sem alteração na estrutura do material. Porém, houve uma diminuição da intensidade desses picos, e isso ocorre devido à ligação covalente do siloxano na superfície das partículas, na qual a presença desse material amorfo (MPTMS) pode cobrir o cristalito alterando a intensidade da medida

Os resultados de hipotermia magnética das amostras SPION, SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA, estão presentes na Figura 82.

Figura 82 - Medida da variação de temperatura em função do tempo sob aplicação do campo magnético alternado externo (109,8 kHz, 24 mT) das amostras sem recobrimento (SPION), recoberta com MPTMS (SPION@MPTS) e funcionalizada com ácido fólico (SPION@MPTMS@CYS-FA).



Fonte: Autoria própria

Observa-se um decréscimo na taxa de aquecimento dos SPIONs após o recobrimento (SPION@MPTMS) e funcionalização (SPION@MPTMS@CYS-FA), de $1,37 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para $0,96$ e $0,84 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. A presença da camada polimérica do silano e da molécula orgânica do ácido fólico, interfere no relaxamento Browniano das partículas devido ao aumento do volume hidrodinâmico, portanto, era esperado essa diminuição no aquecimento.

Para os cálculos de SLP de todas as amostras utilizou-se a Equação 7, com o valor com valor de ρ_i calculado para a massa do metal na suspensão de SPIONs igual a $3,62 \text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ ⁷⁵, e a massa da nanopartícula para as amostras SPION@APTS e SPION@APTS@FA ($5,00 \text{ mg}_{\text{MNP}}/\text{mL}$). Não foi possível determinar a massa do metal para as amostras recobertas com APTS e funcionalizada com ácido fólico, uma vez que as medidas de termogravimetria não foram concluídas por conta da Pandemia, portanto os cálculos foram realizados com a massa das nanopartículas, ocasionando incertezas nos valores obtidos. O valor de ILP foi obtido pela Equação 8 e os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados para os cálculos dos valores de SLP e ILP para as amostras SPION, SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA

Amostra	Concentração		S_m	SLP (W/g)	H (KA/m)	f (kHz)	ILP (nHm ² /Kg)
	mg _{Fe} /mL	mg _{MNP} /mL					
SPION	3,62		0,03124	36,1072	19,1	109,8	0,90
SPION@MPTMS		5	0,04108	34,3757	19,1	109,8	0,86
SPION@MPTMS@ CYS-FA		5	0,02459	20,5769	19,1	109,8	0,51

Fonte: Autoria própria

Embora a modificação e funcionalização da superfície dos SPIONs tenha diminuído a taxa de aquecimento e os valores de SLP e ILP, nota-se na Figura 82, que foi possível elevar a temperatura em até 7,0 e 6,1 °C para as amostras SPION@MPTMS e SPION@MPTMS@CYS-FA, respectivamente. Esse resultado é satisfatório, pois para células tumorais atinjam a temperatura de apoptose (elevar a temperatura corporal de 37°C para que a apoptose ocorra entre 40-45°C)^{76,114}.

5. CONCLUSÕES

Nanopartículas de magnetita foram sintetizadas em meio aquoso pelo método de redução-precipitação. A síntese utiliza íons sulfito (SO₃²⁻) para reduzir ferro(III) em ferro(II), sem necessitar de atmosfera inerte, considerando-se uma metodologia de baixa complexidade e baixo custo, podendo ser produzida em larga escala, tornando-a *green* quando comparada a outras metodologias dispendiosas encontrada na literatura. Porém, as sínteses em meio aquoso possuem algumas desvantagens como a dificuldade de controle do tamanho e forma das nanopartículas e fácil agregação. Entretanto, foi observado melhora no controle morfológico com a metodologia de síntese utilizada e a presença de íons sulfato adsorvidos na superfície das nanopartículas conferiu maior estabilidade em meio aquoso. As nanopartículas obtidas apresentaram tamanho desejado abaixo do tamanho crítico descrito na literatura (< 20 nm), padrão de difração correspondente à fase magnetita, curva de magnetização que demonstra o comportamento superparamagnético e medida espectroscópica comprovando a presença da ligação Fe-O da magnetita.

Realizou-se a modificação da superfície dos SPIONs com o 3-aminopropil-trietóxissilano (APTS), uma síntese considerada *green*, sem utilizar solventes orgânicos, apenas água/metanol. Parâmetros como presença ou ausência de

catalisadores, concentração de silano, proporção água/metanol, dentre outros, influenciaram diretamente no recobrimento. Observou-se que em valores de pH alcalinos, obteve-se melhores resultados devido ao melhor controle na etapa de hidrólise da reação. Mesmo sem a presença de catalisadores (ácido ou alcalino), o APTS é capaz de se autocatalisar devido ao seu caráter básico. Obteve-se melhores resultados para menores concentrações de amino-silano, considerando que mais grupos aminos podem estar disponíveis para posterior etapa de acoplamento com ácido fólico. Resultados de espectroscopia Raman demonstram que o recobrimento com amino-silano ajudou a prevenir a oxidação da superfície das partículas. Mesmo após a modificação da superfície das partículas com o organossilano, elas ainda apresentaram o comportamento superparamagnético.

A modificação da superfície dos SPIONs com MPTMS, foi fundamentada em uma metodologia simples e barata, podendo também ser considerada *green*. Para menores proporções SPION/MPTS obteve-se recobrimentos mais efetivos em torno de partículas individuais ao invés da formação de uma matriz polimérica em torno das partículas. Os resultados de estabilidade coloidal para as amostras recobertas com MPTMS demonstraram melhor estabilidade quando comparados com os SPIONs recobertos com APTS, nas mesmas condições, o que já era esperado visto que grupos aminos possuem caráter básico resultando em potenciais positivos, enquanto os grupos tióis possuem caráter ácido e a sua forma aniônica estabiliza as partículas por repulsão eletrostática. A presença do tiol-silano previne a oxidação da superfície dos SPIONs e foi comprovado pela espectroscopia Raman.

Análises espectroscópicas FTIR, UV-Vis e Raman, comprovaram o acoplamento do grupo carboxilato do ácido fólico com o grupo amino terminal do APTS e a formação da ligação amida. A funcionalização dos SPIONs recobertos com APTS também foi confirmada pelas medidas de estabilidade coloidal, na qual os valores de potencial zeta mudaram de positivos para negativos, e os efeitos de repulsão eletrostática e de impedimento estérico da molécula de ácido fólico auxiliaram na estabilidade das partículas.

O acoplamento da molécula de cisteamina (amino-tiol) com ácido fólico, via ligação amida, foi confirmado pelas análises FTIR e UV-Vis. A funcionalização dos SPIONs recobertos com MPTMS, via ligação dissulfeto com a molécula de ácido fólico modificada com cisteamina foi confirmada pela espectroscopia FTIR, onde se identificou a presença da ligação S-S. Também foi possível observar o acoplamento

do ácido fólico na superfície das nanopartículas por espectroscopia UV-Vis e pelas análises da estabilidade coloidal, permanecendo estáveis mesmo após a funcionalização. Os dados de hipertermia magnética das nanopartículas funcionalizadas são bastante promissores considerando os valores de taxa de aquecimento e a estabilidade coloidal dos sistemas estudados. Técnicas complementares como, por exemplo, termogravimetria deverão ser implementadas para melhorar a precisão dos cálculos de SLP e ILP das partículas modificadas, além de ajustes na otimização da concentração das nanopartículas em meio fisiológico para complementar a compreensão do comportamento em sistemas *ex-vivo*.

Em linhas gerais, os objetivos do trabalho foram cumpridos sendo obtidos sistemas de nanopartículas magnéticas modificadas e funcionalizadas com significativa estabilidade coloidal e resultados promissores para possível aplicação no tratamento de câncer via hipertermia magnética em sistemas biocompatíveis e com reconhecimento celular via presença da molécula de ácido fólico na superfície dos SPIONs.

6. PERSPECTIVAS

Para etapas futuras, pretende-se para este trabalho:

- Aguardar os resultados das análises de termogravimetria que irão proporcionar uma melhor confiabilidade nos cálculos das medidas de hipertermia magnética;
- Aguardar os resultados que ainda faltam das análises de magnometria de amostra vibrante e averiguar se o recobrimento e funcionalização dos SPIONs interferem nas propriedades superparamagnética das partículas;
- Realizar estudo de concentração das amostras para análises de DLS, a fim de obter resultados mais precisos do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, e posteriormente analisar o mesmo estudo em solução de SBF;
- Realizar testes *in vitro*, principalmente as análises de viabilidade celular com e sem a aplicação de campo magnético alternado para avaliar a aplicabilidade dos materiais obtidos;
- Apresentar os resultados do trabalho em congressos e submetê-los a revistas científicas indexadas.

REFERÊNCIAS

1. Dianzani, C. *et al.* Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *Biomed Res. Int.* **2014**, 13 (2014).
2. Mehta, R. V. Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 901–916 (2017).
3. Zhu, N. *et al.* Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials* **8**, 1–27 (2018).
4. Yew, Y. P. *et al.* Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arab. J. Chem.* **13**, 2287–2308 (2020).
5. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
6. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 397–415 (2008).
7. Ali, A. *et al.* Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **9**, 49–67 (2016).
8. Wei, Y. *et al.* Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties. *Procedia Eng.* **27**, 632–637 (2012).
9. Hervault, A. & Thanh, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **6**, 11553–11573 (2014).
10. Hedayatnasab, Z., Abnisa, F. & Daud, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater. Des.* **123**, 174–196 (2017).
11. Gungunes, C. D., Alpsoy, L., Baykal, A., Nawaz, M. & Akal, Z. The Effect of Folic Acid- and Caffeic Acid-Functionalized SPION on Different Cancer Cell Lines. *J. Supercond. Nov. Magn.* **31**, 3579–3588 (2018).
12. Bettini, S. *et al.* A simple approach to synthesize folic acid decorated magnetite@SiO₂ nanostructures for hyperthermia applications. *J. Mater. Chem. B* **5**, 7547–7556 (2017).
13. Ancira-Cortez, A. *et al.* Preparation and Characterization of a Tumor-Targeting Dual-Image System Based on Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Folic Acid and Rhodamine. *J. Nanomater.* **2017**, 1–11 (2017).
14. Razjouyan, J. *et al.* Synthesis and evaluation of radiolabeled, folic acid-PEG conjugated, amino silane coated magnetic nanoparticles in tumor bearing Balb/C mice. *Nukleonika* **60**, 479–502 (2015).

15. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* **25**, 1–15 (2020).
16. AS, C., T, R. & S, M. Development of DNA Nanotechnology and Uses in Molecular Medicine and Biology. *Insights Biomed.* **1**, 1–10 (2016).
17. Nnadozie, E. C. & Ajibade, P. A. Multifunctional Magnetic Oxide Nanoparticle (MNP) Core-Shell: Review of Synthesis, Structural Studies and Application for Wastewater Treatment. *Molecules* **25**, 4110 (2020).
18. Narayanan, K. B. & Sakthivel, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **156**, 1–13 (2010).
19. Kolahalam, L. A. *et al.* Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Mater. Today Proc.* **18**, 2182–2190 (2019).
20. Lindsay, S. M. Introduction to Nanoscience. in *OUP Oxford* 480 (2010). doi:10.1016/s1748-0132(08)70046-x.
21. Callister, W. D. Materials Science and Engineering: An Introduction. in *Jhon Wiley & Sons, Inc.* 960 (1940). doi:10.1007/BF01184995.
22. Coye, J. M. D. Magnetism and Magnetic Materials. in *Cambridge University Press* 625 (2010).
23. Agrawal, D. Introduction to Nanoscience and Nanomaterial. in *World Scientific* 572 (2013).
24. Smart, L. E. & Moore, E. A. Solid State Chemistry: An Introduction. in *CRC Press* vol. 53 444 (2005).
25. Cullity, B. D. & Graham, C. D. Introduction To Magnetic Materials. in *Jhon Wiley & Sons, Inc. - IEEE* 568 (2008).
26. Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
27. Hui, C. *et al.* Large-Scale Fe₃O₄ Nanoparticles Soluble in Water Synthesized by a Facile Method. *J. Phys. Chem. C* **112**, 11336–11339 (2008).
28. Sun, S. Recent advances in chemical synthesis, self-assembly, and applications of FePt nanoparticles. *Adv. Mater.* **18**, 393–403 (2006).
29. Xie, W. *et al.* Shape-, size-and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics. *Theranostics* **8**, 3284–3307 (2018).
30. Rosen, J. E., Chan, L., Shieh, D. Bin & Gu, F. X. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **8**, 275–290 (2012).

31. Riaz, S., Bashir, M. & Naseem, S. Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Modified Co-Precipitation Method. *IEEE Trans. Magn.* **50**, 1–4 (2014).
32. Yoo, M. K. *et al.* Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging. *Acta Biomater.* **8**, 3005–3013 (2012).
33. Carlos, L., Jafelicci, M. & Beck, W. Magnetic and Multifunctional Magnetic Nanoparticles in Nanomedicine: Challenges and Trends in Synthesis and Surface Engineering for Diagnostic and Therapy Applications. *Biomed. Eng. Trends Mater. Sci.* (2011) doi:10.5772/13059.
34. Perecin, C. J. *et al.* Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Aqueous synthesis of magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia: Formation mechanism approach , high water-dispersity and stability. **627**, (2021).
35. Qu, S. *et al.* Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **215**, 190–192 (1999).
36. Sharma, S. K. *et al.* Nanoparticles-based magnetic and photo induced hyperthermia for cancer treatment. *Nano Today* **29**, 1–27 (2019).
37. Hernández, A. A., Gabriel, H., Álvarez, A. & Cariño, R. Iron oxide nanoparticles : synthesis , functionalization , and applications in diagnosis and treatment of cancer. *Chem. Pap.* (2020) doi:10.1007/s11696-020-01229-8.
38. Varanda, L. C. *et al.* Size and shape-controlled nanomaterials based on modified polyol and thermal decomposition approaches. A brief review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* vol. 91 (2019).
39. Wallyn, J., Anton, N. & Vandamme, T. F. Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for in vivo imaging applications—A review. *Pharmaceutics* **11**, 1–29 (2019).
40. Shaw, D. J. Introdução à química dos colóides e superfícies. *Edgard Blücher Ltda* 185 (1975).
41. Jafelicci Junior, M. & Varanda, L. C. O mundo dos coloides. *Química Nov. na Esc.* 9–13 (1999).
42. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
43. Kuchibhatla, S. V. N. T., Karakoti, A. S. & Seal, S. Colloidal stability by surface modification. *Jom* **57**, 52–56 (2005).
44. Strenge, K. *Introduction to Modern Colloid Science. Zeitschrift für Physikalische Chemie* vol. 189 (1995).
45. Hunter, R. J. Foundations of Colloid Science. in *Oxford University Press* vol. 210 816 (2001).

46. Hu, P. *et al.* Heat treatment effects on Fe₃O₄ nanoparticles structure and magnetic properties prepared by carbothermal reduction. *J. Alloys Compd.* **509**, 2316–2319 (2011).
47. Li, Y. S., Church, J. S., Woodhead, A. L. & Moussa, F. Preparation and characterization of silica coated iron oxide magnetic nano-particles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **76**, 484–489 (2010).
48. Bini, R. A., Marques, R. F. C., Santos, F. J., Chaker, J. A. & Jafelicci, M. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy-silanes. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 534–539 (2012).
49. Wu, Y., Lu, Z., Li, Y., Yang, J. & Zhang, X. Surface modification of iron oxide-based magnetic nanoparticles for cerebral theranostics: Application and prospection. *Nanomaterials* **10**, 1–21 (2020).
50. Rother, D., Sen, T., East, D. & Bruce, I. J. Silicon, silica and its surface patterning/activation with alkoxy- and amino-silanes for nanomedical applications. *Nanomedicine* **6**, 281–300 (2011).
51. Garcia-Bennett, A., Nees, M. & Fadeel, B. In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 976–984 (2011).
52. Li, J., Xie, J., Zhu, J. & Tao, J. Multifunctional Nanoparticle Approach for Targeting Melanoma. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **19**, S89–S90 (2018).
53. Arkles, B., Steinmetz, J. R., Zazyczny, J. & Mehta, P. Factors contributing to the stability of alkoxy-silanes in aqueous solution. *J. Adhes. Sci. Technol.* **6**, 193–206 (1992).
54. Liu, Y., Li, Y., Li, X.-M. & He, T. Kinetics of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **29**, 15275–15282 (2013).
55. Issa, A. A. & Luyt, A. S. Kinetics of alkoxy-silanes and organoalkoxy-silanes polymerization: A review. *Polymers (Basel)*. **11**, 537 (2019).
56. Altmann, S. & Pfeiffer, J. The Hydrolysis/Condensation Behaviour of Methacryloyloxyalkylfunctional Alkoxy-silanes: Structure-Reactivity Relations. *Monatshefte fur Chemie* **134**, 1081–1092 (2003).
57. Osterholtz, F. D. & Pohl, E. R. Kinetics of the Hydrolysis and Condensation of Organofunctional Alkoxy-silanes: A Review. *J. Adhes. Sci. Technol.* **6**, 127–149 (1992).
58. Bruce, I. J. & Sen, T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy-silanes and their application in magnetic bio-separations. *Langmuir* **21**, 7029–7035 (2005).
59. Li, L. *et al.* Folic acid-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeting MR imaging. *Drug Deliv.* **23**, 1726–1733 (2016).

60. Wang, W., Tong, C., Liu, B., Liu, X.-Y. & Li, T. Preparation and functional characterization of tumor-targeted folic acid–chitosan conjugate nanoparticles loaded with mitoxantrone. *J. Control. Release* **213**, e110–e111 (2015).
61. Florea, M. G. *et al.* Drug delivery systems based on silica with prolonged delivery of folic acid | Sisteme cu eliberare controlată pe bază de silice cu eliberare prelungită de acid folic. *Rev. Rom. Mater. Rom. J. Mater.* **42**, 313–316 (2012).
62. Wang, J. *et al.* Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. *PLoS One* **7**, 21–25 (2012).
63. Stella, B. *et al.* Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *J. Pharm* **89**, 1452–1464 (2000).
64. Wang, S. & Low, P. S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs , imaging agents , and nucleic acids to cancer cells. *J. Control. Release* **53**, 39–48 (1998).
65. Shubayev, V. I., Pisanic, T. R. & Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 467–477 (2009).
66. Janib, S. M., Moses, A. S. & MacKay, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1052–1063 (2010).
67. Kandasamy, G. & Maity, D. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *Int. J. Pharm.* **496**, 191–218 (2015).
68. Huang, G. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. *Theranostics* **3**, 116–126 (2013).
69. Walters, C. L., Arend, R. C., Armstrong, D. K., Naumann, R. W. & Alvarez, R. D. Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **131**, 493–498 (2013).
70. Salunkhe, A. B., Khot, V. M. & Pawar, S. H. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 572–594 (2014).
71. Chang, D. *et al.* Biologically targeted magnetic hyperthermia: Potential and limitations. *Front. Pharmacol.* **9**, 831 (2018).
72. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
73. Spirou, S. V., Basini, M., Lascialfari, A., Sangregorio, C. & Innocenti, C. Magnetic hyperthermia and radiation therapy: Radiobiological principles and current practice. *Nanomaterials* **8**, 1–22 (2018).
74. Liu, X. *et al.* Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics* **10**, 3793–3815 (2020).

75. He, S. *et al.* Maximizing Specific Loss Power for Magnetic Hyperthermia by Hard–Soft Mixed Ferrites. *Small* **14**, (2018).
76. Lanier, O. L. *et al.* Evaluation of magnetic nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **36**, 687–701 (2019).
77. Marciello, M. *et al.* Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5995 (2013).
78. Ma, M. *et al.* Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **212**, 219–226 (2003).
79. Van De Waterbeemd, M., Sen, T., Biagini, S. & Bruce, I. J. Surface functionalisation of magnetic nanoparticles: Quantification of surface to bulk amine density. *Micro Nano Lett.* **5**, 282–285 (2010).
80. Pallavicini, P. *et al.* Silane-coated magnetic nanoparticles with surface thiol functions for conjugation with gold nanostars. *Dalt. Trans.* **44**, 21088–21098 (2015).
81. Sharon, M. Surface Orchestration of Gold Nanoparticles Using Cysteamine as Linker and Folate as Navigating Molecule for Synaptic Delivery of Doxorubicin. *J. Nanomedicine Res.* **1**, 7 (2014).
82. Vortherms, A. R., Doyle, R. P., Gao, D., Debrah, O. & Sinko, P. J. Synthesis, characterization, and in vitro assay of folic acid conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): Toward targeted AZT based anticancer therapeutics. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **27**, 173–185 (2008).
83. Alupej, L. *et al.* New folic acid-chitosan derivative based nanoparticles - potential applicatios in cancer therapy. **51**, 631–648 (2017).
84. Khademi, S. *et al.* Folic acid-cysteamine modified gold nanoparticle as a nanoprobe for targeted computed tomography imaging of cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C* **89**, 182–193 (2018).
85. Mortera, R. *et al.* Cell-induced intracellular controlled release of membrane impermeable cysteine from a mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system. *Chem. Commun.* 3219–3221 (2009) doi:10.1039/b900559e.
86. Al-Alawy, A. F., Al-Abodi, E. E. & Kadhim, R. M. Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles by Co-Precipitation Method at Different Conditions. *J. Eng.* **24**, 60 (2018).
87. Lente, G. & Fábíán, I. Kinetics and mechanism of the oxidation of sulfur(iv) by iron(iii) at metal ion excess. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 778 (2002) doi:10.1039/b107263c.
88. Lente, G. & Fábíán, I. The Early Phase of the Iron(III) - Sulfite Ion Reaction. Formation of a Novel Iron(III) - Sulfito Complex. *Inorg. Chem.* **37**, 4204–4209

- (1998).
89. Millero, F. J., Gonzalez-davila, M. & Santana-casiano, J. M. Reduction of Fe (III) with sulfite in natural waters. *J. Geophys. Res.* **100**, 7235–7244 (1995).
 90. Yermakov, A. N. & Purmal, A. P. Iron-Catalyzed Oxidation of Sulfite: From Established Results to a New Understanding. *Prog. React. Kinet. Mech.* **28**, 189–256 (2003).
 91. Ramimoghadam, D., Bagheri, S. & Abd Hamid, S. B. Stable monodisperse nanomagnetic colloidal suspensions: An overview. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **133**, 388–411 (2014).
 92. Laurent, S. & Mahmoudi, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* **2**, 367–390 (2011).
 93. Kandpal, N. D., Sah, N., Loshali, R., Joshi, R. & Prasad, J. Co-precipitation method of synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. **73**, 87–90 (2014).
 94. Hui, C. *et al.* Large-scale Fe₃O₄ nanoparticles soluble in water synthesized by a facile method. *J. Phys. Chem. C* **112**, 11336–11339 (2008).
 95. Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm* **17**, 6809–6830 (2015).
 96. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 43 (2015).
 97. Yamaura, M. *et al.* Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **279**, 210–217 (2004).
 98. Ical, Y. S. Infrared Spectra of Ferrites~. *Phys. Rev.* **99**, 1727–1729 (1955).
 99. Bini, R. A., Marques, R. F. C., Santos, F. J., Chaker, J. A. & Jafelicci, M. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 534–539 (2012).
 100. Silversten, R. ., Webster, F. . & Kiemle, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds.
 101. Li, Y.-S., Church, J. S. & Woodhead, A. L. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 1543–1550 (2012).
 102. Shebanova, O. N. & Lazor, P. Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): A new assignment for the vibrational spectrum. *J. Solid State Chem.* **174**, 424–430 (2003).

103. Carlson, J. J. & Kawatra, S. K. Factors affecting zeta potential of iron oxides. *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.* **34**, 269–303 (2013).
104. Ostolska, I. & Wiśniewska, M. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. *Colloid Polym. Sci.* **292**, 2453–2464 (2014).
105. Tombácz, E. *et al.* Polyelectrolyte coating on superparamagnetic iron oxide nanoparticles as interface between magnetic core and biorelevant media. *Interface Focus* **6**, (2016).
106. Honary, S. & Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 255–264 (2013).
107. Al-kazazz, F. F., Al-hakeim, H. K. & Al-aobaid, H. K. Original Research Article. **7**, 42–49 (2017).
108. Sun, Z. X., Su, F. W., Forsling, W. & Samskog, P. O. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. *J. Colloid Interface Sci.* **197**, 151–159 (1998).
109. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409–427 (2016).
110. Cui, Y. *et al.* Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization. *J. Biotechnol.* **150**, 171–174 (2010).
111. Silva, M. P. *et al.* Facile green synthesis of nanomagnets for modulating magnetohyperthermia: Tailoring size, shape and phase. *RSC Adv.* **7**, 47669–47680 (2017).
112. Gneveckow, U. *et al.* Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation-system MFH®300F for clinical magnetic fluid hyperthermia. *Med. Phys.* **31**, 1444–1451 (2004).
113. Andreu, I. & Natividad, E. Accuracy of available methods for quantifying the heat power generation of nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **29**, 739–751 (2013).
114. Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R. & Hadjipanayis, C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. *Int. J. Hyperth.* **34**, 1316–1328 (2018).
115. Singh, M. *et al.* Synthesis and Characterization of Stable Iron Oxide Nanoparticle with Amino Covalent Binding on the Surface for Biomedical Application. *J. Clust. Sci.* **27**, 1383–1393 (2016).
116. Bettini, S. *et al.* A simple approach to synthesize folic acid decorated magnetite@SiO₂ nanostructures for hyperthermia applications. *J. Mater. Chem. B* **5**, 7547–7556 (2017).

117. Mahdavi, M. *et al.* Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules* **18**, 7533–7548 (2013).
118. El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine* **13**, 929–952 (2018).
119. Palimi, M. J., Rostami, M., Mahdavian, M. & Ramezanzadeh, B. Surface modification of Fe₂O₃ nanoparticles with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS): An attempt to investigate surface treatment on surface chemistry and mechanical properties of polyurethane/Fe₂O₃ nanocomposites. *Appl. Surf. Sci.* **320**, 60–72 (2014).
120. Galeotti, F., Bertini, F., Scavia, G. & Bolognesi, A. A controlled approach to iron oxide nanoparticles functionalization for magnetic polymer brushes. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 540–547 (2011).
121. Chandra, S., Mehta, S., Nigam, S. & Bahadur, D. Dendritic magnetite nanocarriers for drug delivery applications. *New J. Chem.* **34**, 648–655 (2010).
122. Brochier Salon, M.-C. & Belgacem, M. N. Competition between hydrolysis and condensation reactions of trialkoxysilanes, as a function of the amount of water and the nature of the organic group. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **366**, 147–154 (2010).
123. Liu, Y., Li, Y., Li, X. M. & He, T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (aptes) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir* **29**, 15275–15282 (2013).
124. Arkles, B. Silane Coupling Agents Connecting Across Boundaries. *Gelest, Inc.* 1–76 (2014).
125. Dodi, G., Hritcu, D., Draganescu, D., Andrei, R. D. & Popa, M. I. Hexagonal-shaped aminosilane magnetite nanoparticles: Preparation, characterization and hybrid film deposition. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **542**, 21–30 (2018).
126. Chairiratanakul, W. *et al.* Effect of amino-, mercapto-silane coupling as a molecular bridge of polyvinyl chloride ion-selective membrane on silicon nitride for nitrate ISFET sensors. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**, (2020).
127. Zeng, Y., Ma, Y. & Wang, G. Reply to comment on ‘Synthesis, characterization and magnetorheological study of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified Fe₃O₄ nanoparticles’. *Smart Mater. Struct.* **28**, 088002 (2019).
128. Chen, W. H. *et al.* Silanization of solid surfaces via mercaptopropylsilatrane: A new approach of constructing gold colloid monolayers. *RSC Adv.* **4**, 46527–46535 (2014).
129. Irmukhametova, G. S., Mun, G. A. & Khutoryanskiy, V. V. Thiolated mucoadhesive and PEGylated nonmucoadhesive organosilica nanoparticles from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane. *Langmuir* **27**, 9551–9556 (2011).

130. Melnyk, I. V. *et al.* Protection of thiol groups on the surface of magnetic adsorbents and their application for wastewater treatment. *Sci. Rep.* **8**, 20–31 (2018).
131. Zaharudin, N. S., Mohamed Isa, E. D., Ahmad, H., Abdul Rahman, M. B. & Jumbri, K. Functionalized mesoporous silica nanoparticles templated by pyridinium ionic liquid for hydrophilic and hydrophobic drug release application. *J. Saudi Chem. Soc.* **24**, 289–302 (2020).
132. De Palma, R. *et al.* Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. *Chem. Mater.* **19**, 1821–1831 (2007).
133. Nuryono, N. *et al.* Coating of magnetite with mercapto modified rice hull ash silica in a one-pot process. *Springerplus* **3**, 1–12 (2014).
134. Villa, S., Riani, P., Locardi, F. & Canepa, F. Functionalization of Fe₃O₄ NPs by silanization: Use of amine (APTES) and thiol (MPTMS) silanes and their physical characterization. *Materials (Basel)*. **9**, (2016).
135. Wang, C.-H., Huang, C.-C., Lin, L.-L. & Chen, W. The effect of disulfide bonds on protein folding, unfolding, and misfolding investigated by FT-Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **47**, 940–947 (2016).
136. Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Rozo, C. E. & Boisen, A. Adsorption and vibrational study of folic acid on gold nanopillar structures using surface-enhanced raman scattering spectroscopy. *Nanomater. Nanotechnol.* **5**, 1–7 (2015).
137. De Campos, R. P. S., Yoshida, I. V. P., Breitzkreitz, M. C., Poppi, R. J. & Fracassi Da Silva, J. A. Raman imaging spectroscopic characterization of modified poly(dimethylsiloxane) for micro total analysis systems applications. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **100**, 67–71 (2013).
138. Yu, Y., Addai-Mensah, J. & Losic, D. Functionalized diatom silica microparticles for removal of mercury ions. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **13**, (2012).
139. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med.* **176**, 148–157 (2015).
140. Karamipour, S., Sadjadi, M. S. & Farhadyar, N. Fabrication and spectroscopic studies of folic acid-conjugated Fe₃O₄@Au core-shell for targeted drug delivery application. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **148**, 146–155 (2015).
141. Vashist, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* **2**, 23–33 (2012).
142. Azcona, P., López-Corral, I. & Lassalle, V. Fabrication of folic acid magnetic nanotheranostics: An insight on the formation mechanism, physicochemical properties and stability in simulated physiological media. *Colloids Surfaces A*

- Physicochem. Eng. Asp.* **537**, 185–196 (2018).
143. Baibarac, M., Smaranda, I., Nila, A. & Serbschi, C. Optical properties of folic acid in phosphate buffer solutions: the influence of pH and UV irradiation on the UV-VIS absorption spectra and photoluminescence. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
 144. Yang, Y. *et al.* Reduction-sensitive CD44 receptor-targeted hyaluronic acid derivative micelles for doxorubicin delivery. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 4361–4378 (2018).
 145. Vikesland, P. J., Rebodos, R. L., Bottero, J. Y., Rose, J. & Masion, A. Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *Environ. Sci. Nano* **3**, 567–577 (2016).
 146. Molahasani, N., Farhadyar, N., Sadjadi, M. S., Shabadra, R. & Gargh, S. L. Synthesis and characterization of folic acid conjugated ZnO/silica core-shell as cancer therapeutic and imaging agent. *Res. J. Biotechnol.* **10**, 25–29 (2015).
 147. Huang, Y., Mao, K., Zhang, B. & Zhao, Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 763–771 (2017).
 148. Teixeira, R. A. R., Lima, F. R. A., Silva, P. C., Costa, L. A. S. & Sant'Ana, A. C. Tracking chemical interactions of folic acid on gold surface by SERS spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **223**, 117305 (2019).
 149. Lasalvia, M. *et al.* Exposure to 1.8 GHz electromagnetic fields affects morphology, DNA-related Raman spectra and mitochondrial functions in human lympho-monocytes. *PLoS One* **13**, 1–26 (2018).
 150. Bonvin, D., Bastiaansen, J. A. M., Stuber, M., Hofmann, H. & Mionić Ebersold, M. Folic acid on iron oxide nanoparticles: Platform with high potential for simultaneous targeting, MRI detection and hyperthermia treatment of lymph node metastases of prostate cancer. *Dalt. Trans.* **46**, 12692–12704 (2017).
 151. Li, L. *et al.* Folic acid-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeting MR imaging. *Drug Deliv.* **23**, 1726–1733 (2016).
 152. Kida, K. *et al.* Small amounts of ethanol attenuate folic acid stability in acidic beverages during storage. *Food Sci. Nutr.* **6**, 214–219 (2018).
 153. Yang, C. *et al.* Fe₃O₄@mSiO₂ core-shell nanocomposite capped with disulfide gatekeepers for enzyme-sensitive controlled release of anti-cancer drugs. *J. Mater. Chem. B* **3**, 1010–1019 (2015).
 154. Biswas, N., Waring, A. J., Walther, F. J. & Dluhy, R. A. Structure and conformation of the disulfide bond in dimeric lung surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1070–1082 (2007).
 155. Xu, Y. *et al.* pH and Redox Dual-Responsive MSN-S-S-CS as a. *Materials (Basel)*. **13**, 1–12 (2020).

156. Das, P., Ray, S., Bhaumik, A., Banerjee, B. & Mukhopadhyay, C. Cubic Ag₂O nanoparticle incorporated mesoporous silica with large bottle-neck like mesopores for the aerobic oxidative synthesis of disulfide. *RSC Adv.* **5**, 6323–6331 (2015).